



UNIVERSIDADE ESTUADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



ALESSANDRO DELFINO DE SOUZA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA O ANESTÉSICO LOCAL
BENZOCAÍNA**

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR THE LOCAL
ANESTHETIC BENZOCAINE**

Campinas
2020

ALESSANDRO DELFINO DE SOUZA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA O ANESTÉSICO LOCAL
BENZOCAÍNA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Ciências Farmacêuticas – Insumos Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO:
ALESSANDRO DELFINO DE SOUZA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ENEIDA DE PAULA.

**Campinas
2020**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89p Souza, Alessandro Delfino de, 1982-
Preparo e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados para o anestésico local benzocaína / Alessandro Delfino de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Eneida de Paula.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 2. Anestésicos locais. 3. Planejamento fatorial. 4. Benzocaína. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and characterization of nanostructured lipid carriers for the local anesthetic benzocaine

Palavras-chave em inglês:

Nanostructured lipid carriers, Local anesthetics, Factorial Design, Benzocaine

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientadora]

Laura de Oliveira Nascimento

Daniele Ribeiro de Araújo

Data de defesa: 29-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do aluno

ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8745-3974>

Curriculo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5893695552610585>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Eneida de Paula

Profa. Dra. Laura de Oliveira Nascimento

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela honra e privilégio de chegar aonde cheguei, depois de tanta batalha, estudando em escolas públicas, me qualificar em uma das melhores universidades da América Latina e fazer o que gosto: estudar e nunca parar de aprender. Além disso, saliento a importância da FAPESP (nº 14/14457-5) e CAPES no apoio financeiro.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra Eneida de Paula, por ter acreditado em mim desde o início, pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldade, pelas broncas e conselhos essenciais à construção do conhecimento, por ter me auxiliado em todo o processo de aprendizagem. Pelos momentos em que trabalhamos juntos, por sua orientação e dedicação, sempre buscando o máximo aprimoramento de seus alunos para que sejam profissionais ainda mais capacitados. Profa. Eneida, para mim, você é um exemplo de professor que gosta realmente do que faz e o executa com altíssima satisfação e qualidade.

Agradeço à minha co-orientadora, Dra Lígia Ribeiro, por ter me guiado, discutido resultados e conduzido com toda a dedicação este projeto.

Agradeço também às valiosas sugestões e contribuições feitas pelos membros da minha banca, professoras Laura de Oliveira Nascimento e Daniele Ribeiro de Araújo, por quem tenho muito carinho e admiração.

Agradeço aos eternos amigos do laboratório de Biomembranas: Gustavo, Juliana, Priscila, Ludmila, Viviane Guilherme, Simone Castro, Gabriela, Talita, Fernando e Fabiola, pessoas pelas quais tenho muito carinho e que apresentaram valiosas contribuições teóricas e práticas em toda construção deste trabalho.

Ao amigo e técnico do laboratório de Biomembranas Márcio Aparecido Paschoal (*in memoriam*) o meu eterno obrigado por sua atenção, amizade e auxílio em todos os momentos desta trajetória. Nunca lhe esquecerei.

À Dra Hery Mitsutake por toda ajuda com as análises físico-químicas e pelo incentivo na pesquisa. Ao Dr. Fabiano Yokaichiya e Dra Margareth Franco, pelas leituras e disponibilidade de discussão dos resultados das medidas de SANS.

À minha família: agradeço aos meus pais, Odair e Iraide, por terem me proporcionado a base emocional e racional sobre a qual eu pude me apoiar para buscar meus objetivos. Ao meu irmão, Leandro, por estar sempre na torcida, acreditando em meu potencial.

Em especial, à minha esposa Camila, aos meus filhos Lucas, Guilherme e Vinícius, pelo amor, paciência, apoio, companheirismo.

RESUMO

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) surgiram no final dos anos 90 como novo sistema de liberação de fármacos para substituir os outros carreadores lipídicos tais como os lipossomas e as nanopartículas lipídicas solidas. Os anestésicos locais podem reversivelmente bloquear a condução do impulso nervoso, aliviando a dor sem a perda da consciência. A benzocaína (BZC) é um anestésico local do tipo éster utilizado principalmente na analgesia tópica (pele e mucosa); sua hidrólise pelas pseudocolinesterases leva a produção de ácido *p*-aminobenzoico que é responsável por reações alérgicas associadas ao uso contínuo de BZC. Neste trabalho, encapsulamos BZC em NLC para aumentar sua biodisponibilidade e reduzir os efeitos adversos. As NLC foram preparadas pelo método de homogeneização por ultrasonicação com palmitato de cetila (lipídio sólido, SL), Capmul®PG8-NF (lipídio líquido, LL) e Pluronic®F68 (surfactante). Um planejamento fatorial 2^3 foi realizado com as variáveis independentes: concentração de lipídios totais (15 – 25%), razão entre lipídios SL:LL (60:40% - 80:20%) e concentração de BZC (1 – 3%). A formulação escolhida (contendo 25% de concentração lipídica total, 60:40% SL:LL, 3% de BZC e 5% de Pluronic®F68) foi caracterizada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e apresentou tamanho de partículas de $180,8 \pm 3,6$ nm, baixo índice de polidispersão ($PDI = 0,090 \pm 0,024$) e potencial zeta negativo ($ZP = -35,2 \pm 0,8$ mV). A eficiência de encapsulação, %EE, foi de 96%. A formulação manteve-se estável durante o período de 1 ano nos quesitos de tamanho, ZP, PDI, partículas/mL, pH (3,8) e %EE. Realizamos caracterizações físico-químicas das NLC por diferentes técnicas tais como DSC, DRX, SANS, Cryo-TEM e MET e todas elas confirmaram a encapsulação de BZC junto a matriz lipídica, sem mudanças estruturais nas nanopartículas. Os ensaios de liberação *in vitro* e os testes antinociceptivos em camundongos mostraram que as formulações de NLC_{BZC} foram capazes de manter a liberação por mais de 20 horas e prolongar o efeito anestésico da BZC por 18 horas. Dessa forma, a formulação permite a redução na dosagem exigida para anestesia, abrindo novas possibilidades para diferentes aplicações clínicas.

Palavras-chave: carreadores lipídicos nanoestruturados, anestésico local, planejamento fatorial, benzocaína, drug-delivery.

ABSTRACT

Nanostructured lipid carriers (NLC) have emerged at the end of the nineties as novel drug delivery systems to replace other lipid-based carriers such as liposomes and solid lipid nanoparticles. Local anesthetics can reversibly block the nerve impulse conduction, alleviating pain without loss of consciousness. Benzocaine (BZC) is an ester type local anesthetic mainly used for topical (skin or mucosa) anesthesia; its hydrolysis by pseudocholinesterase gives rise to *p*-aminobenzoic acid that is responsible for allergic reactions associated to continuous BZC use. In this work, we have encapsulated BZC into NLC to increase its bioavailability and to reduce adverse effects. NLC were prepared by the ultrasound-homogenization method with cetyl palmitate (solid lipid, SL), Capmul® PG8-NF (liquid lipid, LL) and Pluronic® F-68 (surfactant). A 2³ factorial design was conducted with the variables: total lipid (15 - 25%), SL:LL mass ratio (60:40% - 80:20%) and BZC concentration (1 - 3%). The chosen formulation (containing 25% total lipids, 60:40% SL:LL, 3% BZC plus 5% Pluronic®F68) was characterized by Dynamic Light Scattering and showed particle sizes of 180.8 ± 3.6 nm; low polydispersity ($PDI = 0.090 \pm 0.024$) and negative zeta potentials ($ZP = -35.2 \pm 0.8$ mV). The encapsulation efficiency, %EE was 96%. The formulation was stable for 1 year of storage at 25 °C in terms of size, ZP, PDI, number of particles/mL, pH (3.8) and %EE. We have performed NLC physicochemical characterization by different techniques such as DSC, XDR, SANS, Cryo-TEM and TEM and all of them confirmed the encapsulation of BZC in the lipid matrix, with no changes in the nanoparticles structure. *In vitro* release and antinociceptive tests in rats showed that the optimized NLC_{BZC} formulation was able to sustain the release (> 20h) and to prolong the anesthetic effect of benzocaine (18h). Therefore, the formulation allows a reduction in the required anesthesia dose, opening up new possibilities for different clinical applications.

Keywords: nanostructured lipid carriers, local anesthetic, experimental design, benzocaine, drug-delivery

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação de um potencial de ação típico em membranas excitáveis. a = Potencial de repouso da membrana; b = Despolarização; c = Repolarização (adaptado de BRUNTON et al., 2018).
- Figura 2:** Fórmulas estruturais de alguns anestésicos locais utilizados clinicamente. (adaptado de ARAÚJO et al. 2019).
- Figura 3:** Estrutura química das duas principais classes de AL utilizados comercialmente: aminoésteres (A) e aminoamidas (B).
- Figura 4:** Representação geral do canal de Na^+ voltagem dependente. Notar os quatro domínios primários da subunidade α , com seis segmentos helicoidais (S1 a S6) cada, que atravessam membrana. A abertura do poro para entrada de sódio acontece por rotação e extrusão dos segmentos S4 carregados positivamente, acoplado à movimentação dos segmentos S6. Concomitantemente, partes das ligações S4-S5 dos domínios III e IV (que colaboram na formação da abertura interna do canal) e o segmento S6 do domínio IV criam um receptor para uma tríade de aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina-fenilalanina-metionina – sequência IFM) na alça intracelular entre os domínios III e IV, que constitui o portão de inativação pelos AL hidrofóbicos. As subunidades β ($\beta 1$ e $\beta 2$) modulam a eletrofisiologia do canal de Na^+ , servem como moléculas de adesão celular e estabilizam a subunidade α na membrana nervosa (adaptado de BRUNTON et al., 2018).
- Figura 5:** Estrutura química do anestésico local benzocaína (BZC).
- Figura 6:** Esquema ilustrativo das nanopartículas inseridas em uma rede polimérica (gel).
- Figura 7:** NLC imperfeita (A); NLC amorfa (B); múltipla NLC (C) (adaptado de SHAH et al., 2017).
- Figura 8:** Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.
- Figura 9:** Método de preparo do gel de carbopol base (adaptado de SOBRAL, 2012)
- Figura 10:** Teste de *tail flick*. (a) Aparatos utilizados durante o teste de analgesia – *tail flick*, (b) Aplicação local das formulações e (c) animal sendo avaliado quanto à latência analgésica.
- Figura 11:** Cromatograma de BZC detectada a 284 nm, com tempo de retenção em 4,15 min., a 30°C.

- Figura 12:** Curva analítica média da BZC, obtida por CLAE, na faixa de concentração de 0,25 a 37,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Equação da reta: $y = 2,1524x + 0,2175$ e $R^2 = 0,9999$.
- Figura 13:** Efeito dos fatores sobre o tamanho das partículas: (A) Conc. Lipídica total; (B) razão SL:LL; (C) Benzocaína;
- Figura 14:** Interação entre os fatores Conc. Lipídica total e BZC, demonstrando o aumento no diâmetro das partículas.
- Figura 15:** A: Gráfico da interação entre BZC e relação entre lipídios (SL:LL). Reta em preto: BZC a 1% (menor nível); reta em vermelho: BZC a 3% (maior nível); B: Superfície de resposta 3D para PDI. Fator atual: Concentração lipídica total: 20%.
- Figura 16:** Gráfico dos efeitos sobre o potencial zeta: (A) Conc. Lipídica total; (B) Benzocaína;
- Figura 17:** A: Gráfico de desejabilidade obtido a partir das propriedades de interesse desejadas; B: Resposta prevista para tamanho de partículas; C: Resposta prevista para PDI; D: Resposta prevista para ZP; Concentração de BZC no nível alto (3%);
- Figura 18:** Medidas de estabilidade ao longo do tempo (360 dias), na temperatura ambiente. A) Variação do tamanho médio das partículas em função tempo; B) Variação do PDI; C) Variação do potencial Zeta; D) Variação do nº partículas/mL; E) %EE e F) Variação do pH. NLC_{BZC} = formulação otimizada, contendo BZC; NLC = controle, sem benzocaína. Análise estatística: One way ANOVA: $p < 0.05$.
- Figura 19:** MET: Micrografias das nanopartículas lipídicas otimizadas, sem (A e B) e com (C e D) benzocaína, em duas magnitudes: 60.000x (A e C) e 100.000x (B e D). Escala = 200 nm.
- Figura 20:** Cryo-TEM. Micrografias (MET) das NLC (A e C) sem fármaco e com BZC (B e D); nas seguintes escalas: 1 μm (A e B) e 200 nm (C e D).
- Figura 21:** Termograma da BZC.
- Figura 22:** Termograma NLC, palmitato de cetila e Pluronic F68.
- Figura 23:** Termogramas da formulação otimizada (NLC_{BZC}) e da mistura física de seus componentes.
- Figura 24:** Termogramas para as amostras de BZC, NLC e NLC_{BZC} .
- Figura 25:** DRX - Difratoograma da BZC.
- Figura 26:** DRX – Difratoogramas dos excipientes: (A) palmitato de cetila; (B) Pluronic P68.
- Figura 27:** DRX – Difratoograma de NLC_{BZC} , NLC e Mistura física.

- Figura 28:** Espectro de SANS dos NLC sem fármaco em diferentes temperaturas: A) 25°C; B) 37°C e C) 40°C.
- Figura 29:** Efeito de BZC no espectro de SANS nos NLC em diferentes temperaturas: A) 25°C; B) 37°C e C) 40°C.
- Figura 30:** Perfil de liberação *in vitro* de BZC livre e encapsulada na NLC_{BZC}, durante 25 horas, na temperatura de 37°C.
- Figura 31:** Modelo esquemático do perfil de liberação a partir das NLC_{BZC}.
- Figura 32:** Ensaios de ação antinociceptiva (efeito máximo possível, %EMP, teste de *tail flick* - em camundongos) em função do tempo. Teste estatístico: One-way ANOVA com Turkey-Kramer *post hoc*: $p < 0.05$.
- Figura 33:** Área sob a curva (efeito-tempo) após aplicação tópica de benzocaína: Benzotop® (20%) e BZC 3%, NLC_{BZC} a 1,5 e 3,0%. Análise estatística: One-way ANOVA com Turkey-Kramer *post hoc*: a, BZC 3,0% x BZC 20%; b, BZC 20% x NLC_{BZC} 3,0%; c, NLC_{BZC} 3,0% x NLC_{BZC} 1,5%; d, BZC 3,0% x NLC_{BZC} 1,5%; e, BZC 20% x NLC_{BZC} 1,5%. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Propriedades dos compostos empregados neste trabalho.
- Tabela 2:** Condições cromatográficas para quantificação de BZC.
- Tabela 3:** Componentes utilizados no preparo do gel base (adaptado de SOBRAL, 2012).
- Tabela 4:** Grupos experimentais das formulações para avaliação da atividade antinociceptiva.
- Tabela 5:** Equações da reta e coeficientes de correlação obtidos através das curvas analíticas para quantificação da BZC por CLAE, em três dias consecutivos.
- Tabela 6:** Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR1, DPR2 e DPR3) e inter-dias, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de BZC.
- Tabela 7:** Resultados do teste de precisão. Comparação entre a concentração teórica e as obtidas experimentalmente para BZC, em três dias de experimentos e análise inter-dias.
- Tabela 8:** Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação de BZC por CLAE.
- Tabela 9:** Resultados preliminares das formulações com diferentes tipos de lipídios.
- Tabela 10:** Planejamento fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central, usado para preparo de NLC contendo benzocaína.
- Tabela 11:** Resultados obtidos (tamanho, PDI e ZP) para as formulações dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo BZC (NLC_{BZC}), preparadas de acordo com o planejamento fatorial 2^3 .
- Tabela 12:** Análise da variância para a resposta tamanho de partículas, no planejamento fatorial.
- Tabela 13:** Análise da variância para a resposta PDI no planejamento fatorial.
- Tabela 14:** Análise da variância para a resposta potencial zeta, no planejamento fatorial.
- Tabela 15:** Comparação entre os resultados previstos pelo programa e os encontrados experimentalmente.
- Tabela 16:** Propriedades da formulação otimizada, e seu controle (sem BZC). Estas formulações foram utilizadas para caracterização e demais testes. NLC = carreador lipídico nanoestruturado sem BZC, NLC_{BZC} = carreador lipídico nanoestruturado com BZC a 3%.
- Tabela 17:** Tamanho médio e dados cumulativos do diâmetro das partículas, determinados por NTA. Valores expressos em média \pm d.p., com $n = 3$. D10, D50, D90 refere-

se ao diâmetro com base em 10%, 50% e 90% do perfil de distribuição cumulativa.

Tabela 18: Entalpia de fusão e Índice de cristalinidade (IC) determinados por análise dos termogramas de DSC.

Tabela 19: Entalpia, temperatura, entropia e energia livre de Gibbs das amostras de palmitato de cetila (CP), NLC e NLC_{BZC}.

Tabela 20: SANS - Parâmetros de rede da amostra NLC_{BZC}, com o aumento da temperatura.

Tabela 21: Ajuste matemático das curvas de liberação da BZC a partir da NLC otimizada.

LISTA DE ABREVIACÕES

AL	Anestésicos locais
BZC	benzocaína
pH	potencial hidrogeniônico
DDS	drug delivery systems
SLN	nanopartículas lipídicas sólidas
NLC	carreador lipídico nanoestruturado
CP	palmitato de cetila
P68	Pluronic®F68
NLC _{BZC}	benzocaína encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
SL	lipídio sólido
LL	lipídio líquido
PDI	índice de polidispersão
ZP	potencial zeta
NTA	análise de rastreamento de partículas
%EE	Eficiência de encapsulação
MET	microscopia eletrônica de transmissão
Cryo-TEM	criomicroscopia eletrônica de transmissão
DSC	calorimetria exploratória de varredura
DRX	difração de raio-X
SANS	difração de nêutrons
%EMP	efeito antinociceptivo máximo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dor.....	16
1.2 Anestésicos Locais	17
1.2.1 Benzocaína.....	21
1.3 Via de administração tópica.....	22
1.4 Sistema de liberação sustentada de fármacos	25
1.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados	25
1.4.2 Composição lipídica dos NLC	28
1.4.2.1 Palmitato de Cetila	29
1.4.2.2 Capmul® PG-8 NF.....	30
1.4.2.3 Pluronic® P68.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAIS.....	33
3.1.1 Reagentes.....	33
3.1.2 Equipamentos.....	33
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Quantificação de BZC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e validação da metodologia de quantificação	35
3.2.2 Seleção dos lipídios	37
3.2.3 Preparo dos NLC contendo benzocaína	37
3.2.4 Otimização das NLC por planejamento fatorial	38
3.2.5 Caracterização físico-química dos NLC.....	38
3.2.5.1 Medida de Tamanho e índice de polidispersão (PDI).....	38
3.2.5.2 Medidas de potencial zeta	38
3.2.5.3 Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA)	39
3.2.5.4 Potencial hidrogeniônico (pH)	40
3.2.5.5 Determinação do teor de BZC nas nanopartículas	40
3.2.5.6 Eficiência de encapsulação e capacidade de armazenamento	40
3.2.5.7 Microscopia eletrônica de transmissão	41

3.2.5.8	Criomicroscopia eletrônica	41
3.2.5.9	Calorimetria diferencial exploratória	42
3.2.5.10	Difração de Raio-X	43
3.2.5.11	Difração de Nêutrons.....	43
3.2.6	Ensaio de cinética de liberação <i>in vitro</i> da BZC.....	44
3.2.7	Avaliação da estabilidade das formulações	46
3.2.8	Avaliação da atividade antinociceptiva <i>in vivo</i>	46
3.2.8.1	Preparação de gel de carbopol.....	46
3.2.8.2	Avaliação farmacológica <i>in vivo</i>	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Quantificação de Benzocaína por CLAE.....	50
4.2	Seleção dos lipídios	53
4.3	Otimização das NLC por planejamento experimental	54
4.3.1	Interpretação das respostas obtidas no planejamento fatorial de NLC _{BZC}	56
4.3.1.1	Efeito dos fatores sobre o tamanho das partículas	56
4.3.1.2	Efeito dos fatores sobre o índice de polidispersão	58
4.3.1.3	Efeito dos fatores sobre o potencial zeta.....	59
4.3.1.4	Otimização das formulações	61
4.3.2	Análise por rastreamento de nanopartículas	63
4.3.3	Eficiência de encapsulação da BZC	64
4.3.4	Estudo da estabilidade das formulações	65
4.3.5	Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão	67
4.3.6	Análises de Criomicroscopia eletrônica	67
4.3.7	Análise por Calorimetria Diferencial de Varredura	69
4.3.8	Análise por difração de raio-X.....	72
4.3.9	Análise por difração de nêutrons.....	75
4.4	Medidas da cinética de liberação <i>in vitro</i>	78
4.4.1	Modelagem matemática dos perfis de liberação <i>in vitro</i>	79
4.5	Ensaio <i>in vivo</i> : atividade antinociceptiva	81
5.	CONCLUSÕES	84
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
7.	ANEXO	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor foi e continua sendo uma das grandes preocupações da humanidade. Desde os primórdios da civilização, de acordo com os registros gráficos da pré-história e com os vários documentos escritos posteriormente, o ser humano procura entender as causas da dor e desenvolver procedimentos destinados ao seu controle (NETO et al., 2009).

De acordo com a *Internacional Association for the Study of Pain* (IASP), dor é interpretada como uma experiência sensorial e emocional desagradável que pode ser associada a dano tecidual real ou potencial, expressada através de uma reação orgânica e ou emocional, envolvendo processos fisiológicos na integração, processamento e modulação de informações nociceptivas que se processam em diferentes níveis do sistema nervoso central (BARKE, 2020).

Segundo McLure & Rubin (2005), o impulso nervoso de determinado estímulo, seja ele químico, físico ou elétrico, é consequência da elevação gradativa da permeabilidade da membrana neuronal aos íons de sódio. Sendo assim, ocorre aumento do potencial de membrana, desencadeando a propagação do potencial de ação ao longo das fibras nervosas. Cada potencial de ação começa pela alteração súbita do potencial de membrana negativo para positivo, terminando com a repolarização quase tão rápida quanto a despolarização (Figura 1). Para conduzir o sinal nervoso, o potencial de ação se desloca ao longo da fibra nervosa até a sua extremidade final (BRUNTON et al., 2018).

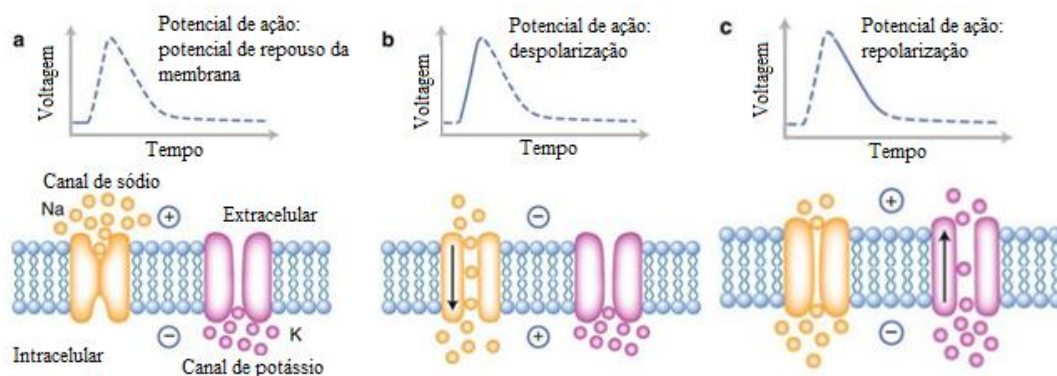


Figura 1. Representação de um potencial de ação típico em membranas excitáveis. a = Potencial de repouso da membrana; b = Despolarização; c = Repolarização (adaptado de BRUNTON et al., 2018).

A dor é responsável pelas frequentes procuras por atendimento médico pela população de todo mundo. A duração e a intensidade com que o problema acontece podem comprometer a vida de uma pessoa. Dessa forma, muitos trabalhos são realizados no intuito de desenvolver novos agentes terapêuticos ou melhorar as características físico-químicas dos fármacos utilizados no alívio da dor. Os anestésicos locais estão entre as opções terapêuticas disponíveis para este tratamento (de ARAÚJO et al., 2004; GORDON et al., 2010; BRUNTON et al., 2018).

1.2 Anestésicos Locais

Anestésicos locais (AL) são agentes que bloqueiam reversivelmente a condução nervosa quando aplicados em uma área circunscrita do corpo. Embora numerosas substâncias de diversas estruturas químicas sejam capazes de produzir anestesia local, a maioria dos fármacos de utilidade clínica comprovada tem em comum a configuração fundamental do primeiro anestésico local descrito, a cocaína.

De fato, o interesse nas propriedades psicotrópicas da *Erithroxylon coca* levou ao isolamento da cocaína por Niemann em 1860 (CATTERALL & MACKIE, 2017).

A potência da cocaína levou à sua aceitação geral como AL. Porém, várias mortes atribuídas a cocainização aguda deram prova do baixo índice terapêutico do fármaco, sendo posteriormente retirada do mercado (WILES & NATHANSON, 2010; RANG et al., 2016).

Em 1905, Ein Horn foi responsável pela síntese da procaína, fármaco este que serviu de protótipo para a descoberta dos AL utilizados clinicamente até os dias atuais (Figura 2).

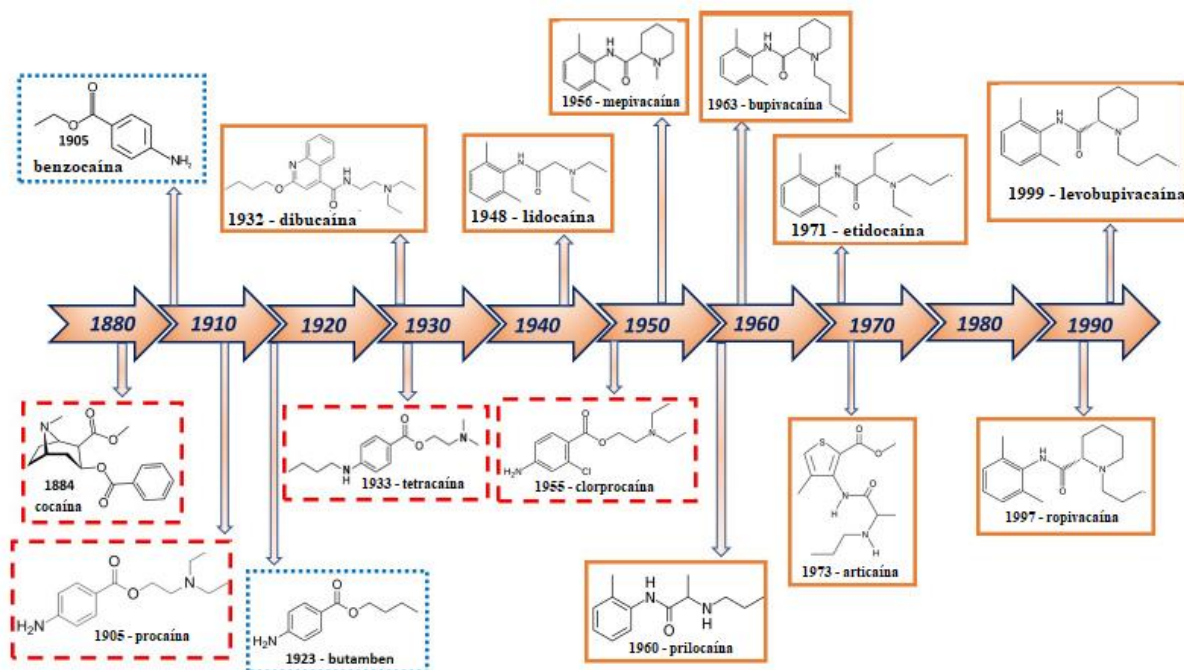


Figura 2. Fórmulas est/ruturais de alguns anestésicos locais utilizados clinicamente. (adaptado de ARAÚJO et al. 2019).

Estes fármacos são substâncias anfifílicas que tem a capacidade de impedir de forma reversível a propagação do impulso nervoso, responsável pela perda da sensibilidade tátil, térmica e motora no local da aplicação, sem provocar a perda de consciência ou danos nas fibras e células nervosas (BRUNTON et al., 2018; LIRK et al., 2014; CATTERAL & MACKIE, 2017). AL bloqueiam a condução nervosa através da interrupção do influxo dos íons sódio nos canais voltagem-dependentes presentes na membrana neural, inibindo, assim, a mudança conformacional da proteína do canal para o estado aberto (WANG et al., 1998; WANG & STRICHARTZ, 2012; WEINIGER et al., 2012; COLUMB & HARTLEY, 2014).

A maioria dos anestésicos locais tem uma porção hidrofóbica (em geral hexanel aromático) separado de um grupo amino ionizável. A cadeia alifática, que liga ambos grupamentos, pode ser do tipo éster ou amida (Figura 3). Portanto, os agentes que apresentam uma ligação éster são denominados aminoésteres. Estes compostos foram os primeiros a serem sintetizados, e apresentam fármacos como a procaina, tetracaina e clorprocaína (HEAVNER, 2007; SHAH et al., 2018). Por outro lado, os AL que possuem o grupo amida na cadeia alifática são chamados de aminoamidas, sendo estes de maior utilização na prática clínica, tendo como exemplos a lidocaína, prilocaína, bupivacaína e etidocaína (SCOTT ALTMAN et al., 1985; GLAZER & PORTENOY, 1991). O grupamento amino confere à molécula do fármaco característica hidrofílica, enquanto o grupo aromático proporciona lipossolubilidade. Sendo assim, a forma lipossolúvel dos AL (não ionizada, neutra ou base) responde pela difusão através

das membranas dos axônios, enquanto a forma ionizada (protonada, cloridrato ou sal) atende a solubilidade e difusão em meio aquoso.

A benzocaína, AL estudado nesta dissertação, pertence à família dos ésteres, porém não possui o grupo amino terminal, de forma que se encontra sempre neutra, acima de pH 3.0.

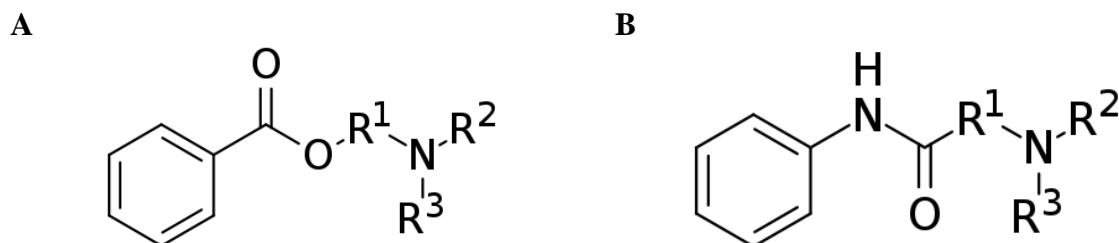


Figura 3: Estrutura química das duas principais classes de AL utilizados comercialmente: aminoésteres (A) e aminoamidas (B).

Segundo NARAHASHI et al. 1970, a forma ionizada dos AL apresenta interação com a alça intracelular da subunidade alfa dos canais de sódio voltagem-dependentes, próximo ao portão de inativação do poro. Em 1996, RAGSDALE et al. demonstraram a interação da forma neutra do AL com aminoácidos da alfa-hélice transmembranar S6, no domínio IV do canal de sódio voltagem-dependente, incluindo a benzocaína (Figura 4). Dessa forma, ambas as formas de ionização dos AL bloqueiam o influxo dos íons Na⁺, o que impossibilita reversivelmente a propagação do estímulo doloroso (RANG et al., 2016).

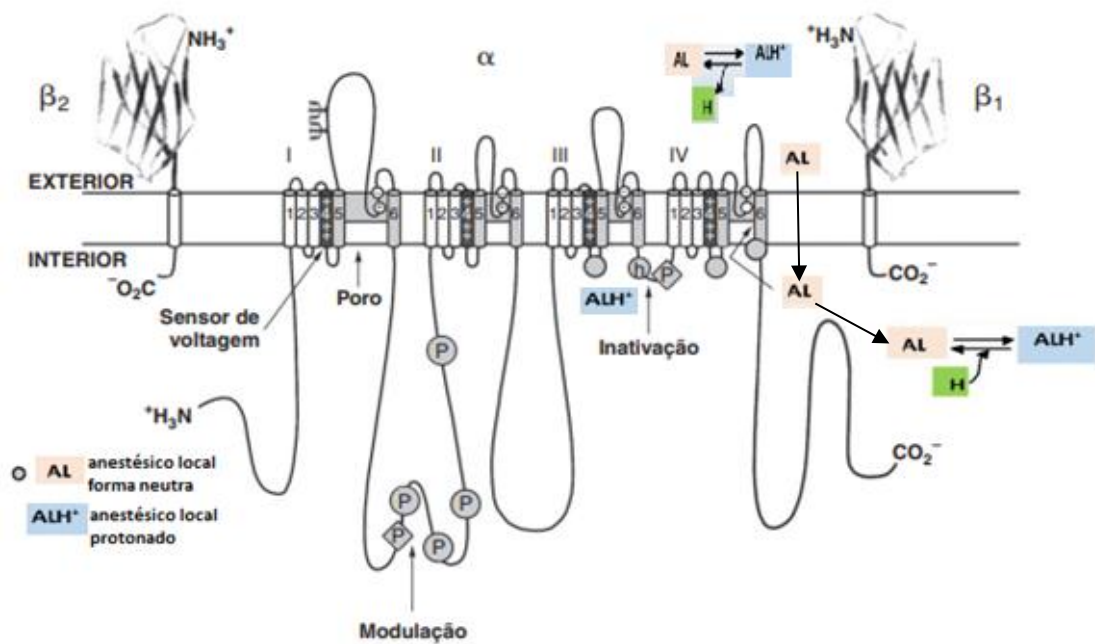


Figura 4. Representação geral do canal de Na⁺ voltagem dependente. Notar os quatro domínios primários da subunidade α , com seis segmentos helicoidais (S1 a S6) cada, que atravessam membrana. A abertura do poro para entrada de sódio acontece por rotação e extrusão dos segmentos S4 carregados positivamente, acoplado à movimentação dos segmentos S6. Concomitantemente, partes das ligações S4-S5 dos domínios III e IV (que colaboram na formação da abertura interna do canal) e o segmento S6 do domínio IV criam um receptor para uma tríade de aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina-fenilalanina-metionina – sequência IFM) na alça intracelular entre os domínios III e IV, que constitui o portão de inativação pelos AL hidrofóbicos. As subunidades β (β_1 e β_2) modulam a eletrofisiologia do canal de Na⁺, servem como moléculas de adesão celular e estabilizam a subunidade α na membrana nervosa (adaptado de BRUNTON et al., 2018).

A anestesia local é um dos mecanismos terapêuticos mais usados para amenizar a ansiedade, dor e desconforto durante um procedimento cirúrgico dermatológico. As principais formulações anestésicas de uso tópico estão disponíveis na forma de cremes e géis. Contudo, a eficácia da analgesia no local da injeção ou procedimento cirúrgico é questionável. Por isso, novas formulações estão sendo desenvolvidas para aumentar a potência e prolongar o efeito anestésico no local da administração (PARK & SHARON, 2017).

Atualmente, na anestesia tópica (pele, mucosa e olhos) há predomínio na utilização dos AL da classe dos aminoésteres, ao passo que, há amplo uso dos AL do grupo amida no uso injetável, pois devido ao seu metabolismo hepático raramente irão provocar reações alérgicas (LAGAN & McLURE, 2004; MALAMED, 2013).

A potência dos AL é determinada de acordo com a sua estrutura e suas propriedades físico-químicas (de ARAÚJO et al., 2003). Contudo, a toxicidade dos compostos anestésicos é diretamente proporcional à sua potência, o que impede a busca de substâncias mais ativas (de

ARAÚJO et al., 2003; 2019; de PAULA et al., 2012). A lipofilicidade garante a permanência dos AL nos neurônios, mantendo a nocicepção, ao passo que a solubilidade em meio aquoso é fundamental para o transporte e ionização (BUTTERWORTH & STRICHARTZ, 1990).

Atualmente, as formulações comerciais disponíveis de AL apresentam diferentes formas farmacêuticas, dosagens e ativos. Todavia, a maioria dos compostos propicia tempo de analgesia limitado médio de quatro horas. A síntese de novos compostos, uso em associação medicamentosa com anti-hipertensivos (VAN TUIJL et al., 2006), anti-inflamatórios, vasoconstritores e opióides (QUEIRÓZ, 2012) ou a utilização de novas formas farmacêuticas, em sistemas de liberação sustentada (*Drug delivery Systems*, DDS) (de PAULA et al., 2010; de ARAÚJO et al., 2019) são as estratégias utilizadas para aumentar o tempo de ação dos anestésicos locais.

1.2.1 Benzocaína

A benzocaína (BZC) é um derivado da procaína no qual a terminação amina está ausente (Figura 5). Pouco solúvel em meio aquoso, o fármaco tende a permanecer no sítio de aplicação e não é prontamente absorvido na circulação sistêmica, sendo amplamente aplicado de maneira tópica, para anestesia dérmica ou mucosas (STRICHARTZ et al 1990; de ARAUJO et al., 2008; MALAMED, 2013; MURA et al., 2008; LEE, 2016). Devido ao seu baixo potencial tóxico, a BZC é especialmente útil para anestesia de grandes áreas superficiais na cavidade oral.

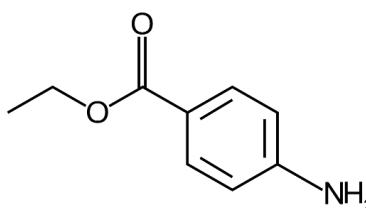


Figura 5: Estrutura química do anestésico local benzocaína (BZC).

A ausência do grupo amino na BZC, presente nos demais AL da família dos ésteres como procaína e tetracaína (Figura 2), impede a ionização deste composto em pH fisiológico, mantendo-a na sua forma neutra. O grupamento NH_2 no anel benzoico tem $\text{pK}_a = 2,51$, de forma que, somente abaixo disso, a BZC sofrerá ionização (FRACETO et al., 2006).

Este AL apresenta baixa toxicidade no sistema cardiovascular, assim como baixa absorção. Porém, efeitos adversos, como a metahemoglobinemia, foram relacionados à sua

absorção sistêmica (MARTIN et al. 1995; SACHDEVA et al., 2003; DAHSHAN & DONOVAN, 2006). A hidrólise da ligação éster da BZC, ocasionada pelas esterases plasmáticas, leva a formação de ácido p-aminobenzoico (PABA) e etanol. De acordo com MARTIN et al., 1995, a oxidação da hemoglobina em metahemoglobina ocorre pela n-hidroxilação do PABA, formando n-hidroxi PABA. O uso prolongado e repetido deste AL também pode provocar reações alérgicas localmente, devido a formação do composto PABA (MALAMED, 2013; LEE, 2016).

Atualmente, na clínica odontológica, o gel de BZC é o anestésico tópico mais utilizado (MALAMED, 2013). Sua ação é rápida, apresenta excelente anestesia superficial, porém de curta duração (COVINO, 1986; PRIMOSCH & ROLLAND-ASENSI, 2001; NAYAK & SUDHA, 2006; MURA et al., 2007).

1.3 Via de administração tópica

Segundo LIN et al., 2018, a pele é o maior órgão do corpo humano e está constantemente exposta aos danos químico, físicos e microbiológicos. A mesma funciona como uma barreira de proteção para todo o corpo. Ela permite a conservação da homeostasia do corpo através do controle térmico, hidrodinâmico e do metabolismo, além de possibilitar a percepção de estímulos sensoriais. Seu revestimento é de composição complexa e multifuncional, sendo dividido histologicamente em duas camadas teciduais distintas: a derme e a epiderme (SOUTO & LOPES, 2011; CEREDA, 2013).

A derme é a porção mais densa e está localizada mais internamente, adjacente à epiderme, e mede aproximadamente 250 µm, é uma região vascularizada onde existem as terminações nervosas livres responsáveis pela sensação de dor, sendo, portanto, a camada-alvo dos anestésicos locais de uso tópico. (CEVC, 2004; TADICHERLA & BERMAN, 2006; SAWYER et al., 2009; CEREDA, 2013).

A epiderme é a camada externa e sem vascularização que mede em média 50 µm de espessura, que se apresenta revestida pelo estrato córneo, que é praticamente impermeável e constitui-se como principal barreira de proteção da pele, limitando a absorção de fármacos e cosméticos (CEVC, 2004; TADICHERLA & BERMAN, 2006). O estrato córneo é composto principalmente pelos corneócitos que são células desidratadas, anucleadas e cheias de queratina (SOUTO & LOPES, 2011). Nas camadas mais superficiais da pele, a organização dos

corneócitos vai se tornando frouxa e desorganizada, levando a descamação (ECKHART et al., 2013; CONSTANZO et al., 2015).

A liberação de emulsão de lipídios e conteúdos aquosos provenientes das glândulas sudoríparas, sebáceas e produtos da queratinização acontece no estrato córneo. As células mortas são embebidas por essas secreções, que são responsáveis por conferir a camada superficial da pele, pH entre 4,0 – 5,5. Na interface celular encontra-se a matriz intercelular que contém uma mistura de ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol (HADGRAFT, 2001).

A administração pela via tópica ou cutânea é a principal via de permeação para fármacos e ativos cosméticos e cosmeceúticos. Ela consiste na aplicação de medicamento sobre a superfície cutânea ou mucosa, sendo este absorvido pela camada epidérmica para dentro da derme. A permeabilidade na pele é influenciada pelas características físico-químicas das moléculas e pelas condições da pele (de ARAÚJO et al., 2013; HERMAN & HERMAN, 2015).

A permeabilidade dos fármacos através da pele ocorre pela difusão através das vias intercelular, transcelular, transfolicular e transglandular (de ARAÚJO et al., 2013, CEREDA, 2013). Muitas moléculas podem ser irritantes para as células da epiderme, apresentar baixa permeabilidade por essas vias, podem não apresentar estabilidade adequada ou, ainda, não atingir o local desejado para sua ação (NAIK et al., 2000; WALTER & XU, 2015).

Os promotores químicos são substâncias capazes de melhorar o transporte de fármacos através da pele, pela redução temporária e reversível das suas propriedades barreira e consequente aumento da permeabilidade (NAIK et al., 2000; BARRY, 2001; KARANDE & MITRAGOTRI, 2009). Eles podem aumentar o transporte de ativos através da pele, agindo diretamente sobre a sua estrutura da pele, atuando sobre os lipídios intercelulares ou sobre os corneócitos, extraindo lipídios da pele, criando vias de difusão para o fármaco, ou inserindo moléculas anfifílicas nas bicamadas, perturbando a sua estrutura organizada e causando a sua fluidificação. Eles podem, também, aumentar a atividade termodinâmica do fármaco, promover hidratação do estrato córneo, alterar as propriedades dos corneócitos ou aumentar o coeficiente de partição do fármaco, proporcionando uma difusão adequada do mesmo através da pele (PRAUSNITZ & LANGER, 2008; KARANDE & MITRAGOTRI, 2009; PAUDEL et al., 2010; SILVA et al., 2010; KALLURI & BANGA, 2011).

A combinação entre promotores químicos constitui uma estratégia para melhorar não só a potência destes compostos, como também a sua segurança, devido à complementaridade de mecanismos de ação que podem resultar em efeitos sinérgicos sobre a permeação de fármacos (KARANDE & MITRAGOTRI, 2009).

Uma das estratégias utilizadas é o encapsulamento do fármaco em nanoestruturas (COSTA & SANTOS, 2017), destacando os sistemas micro ou nanoemulsionados como nanopartículas lipídicas e lipossomas (ver item 1.4.1). A promoção da permeação de fármacos por intermédio de nanopartículas lipídicas é conseguida através de efeitos de aderência, oclusão e hidratação da pele. As suas propriedades adesivas levam à formação de uma monocamada hidrofóbica na pele que produz um efeito oclusivo e leva à diminuição da perda de água transepidérmica originando uma redução da organização dos corneócitos e a um aumento do espaço inter-corneocitário, com a consequente penetração do fármaco para as camadas mais profundas (THASSU, 2007; VITORINO et al, 2013).

O sistema de liberação sustentada baseados em lipídios permite uma maior permeação do fármaco, quando comparamos com a molécula do ativo livre. Ele promove ainda uma liberação sustentada e/ou direcionada do fármaco, melhorando sua estabilidade e diminuindo, assim, possíveis efeitos irritantes (UPRIT et al., 2013; WALTER & XU, 2015; MONTENEGRO et al., 2016).

Sistemas híbridos, com nanocarreadores em hidrogéis, são bastante úteis para aplicação tópica. Entre os diversos polímeros, os carboxivinílicos ou carbômeros (carbopols) são os mais utilizados para a formação de hidrogéis. Eles são materiais de baixo potencial tóxico e irritante, não apresentando evidência de hipersensibilidade à sua estrutura (SAHOO et al., 2014). A fim de se adquirir a viscosidade desejável, esse tipo de polímero aniônico deve sofrer um processo de neutralização durante o seu preparo como gel base (da SILVA et al., 2008). Sistemas híbridos são constituídos de dois ou mais materiais distintos que levam a formação de uma única formulação que apresentam propriedades físico-químicas e biológicas únicas, inalcançáveis pelos carreadores em separado (MERINO et al., 2015; GAO et al., 2016).

No sistema híbrido formado por gel e sistema nanoparticulado, cria-se uma rede polimérica 3D (Figura 6). Este sistema chama atenção pois permite enfrentar os desafios biológicos e médicos, uma vez que através dele é permitido criar um sistema de liberação sustentada e direcionada do fármaco no local de ação (GAO et al., 2016).

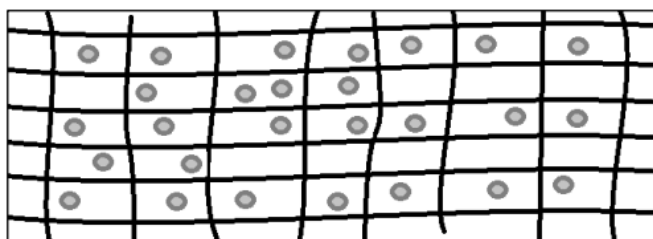


Figura 6: Esquema ilustrativo das nanopartículas inseridas em uma rede de gel.

1.4 Sistema de liberação sustentada de fármacos

O sistema de liberação sustentada de fármacos, do inglês *drug-delivery systems* (DDS), apresenta como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração do fármaco *in situ*, tendo como intuito principal a minimização dos efeitos adversos e a maximização do benefício clínico (UCHEGBU & SCHATZLEIN, 2006).

Dentre as estratégias mais utilizadas, a associação química ou física de fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas, que ao serem aplicados *in vivo* tenham capacidade de modular sua quantidade de liberação ou entrega em sítio específico (*targeting*). Trabalhos apontam a utilização de carreadores com materiais poliméricos (GRILLO et al., 2010; OH et al., 2010), materiais inorgânicos (GHOSH et al., 2008; SLOWING et al., 2008) e materiais de natureza lipídica (MÜLLER et al. 1996, de ARAÚJO et al., 2019).

Segundo COLLETT & MORETIN (2005), um sistema de liberação ideal deve ter as seguintes características: rápido alcance e manutenção da concentração terapêutica, ser capaz de aumentar ou manter a estabilidade física e química do medicamento, e acima de tudo, ser um sistema otimizado que potencialize a eficiência, segurança e confiabilidade do fármaco (de ARAÚJO et al., 2003). O sistema permite a diminuição da toxicidade dos fármacos, além de melhorar a seletividade e eficácia e aumentar o tempo de ação (RIZVI & SALEH, 2018).

1.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas no início dos anos 90 como veículos alternativos inovadores aos carreadores tradicionais para liberação sustentada de fármacos, tais como: lipossomas, nanopartículas poliméricas e emulsões (PARDEIKE et al. 2009; PUGLIA & BONINA, 2012).

As Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN) foram alvo de inúmeras pesquisas, com aplicabilidade para uma variedade de fármacos hidrofóbicos (PUGLIA et al., 2011; BATTAGLIA & GALLARATE, 2012; BRUGÈ et al., 2015; DOKTOROVÁ et al., 2016; RIBEIRO et al., 2017; BARBOSA et al., 2018a). A primeira geração das nanopartículas lipídicas foram as SLN, formadas por substituição da fase oleosa nas nanoemulsões (líquidas) por um lipídio sólido, à temperatura ambiente ou corporal (ZUR MÜHLEN et al. 1998).

Em geral, o diâmetro médio das SLN, entre 50-1000 nm, representou um grande avanço na área cosmética e farmacêutica (ZUR MÜHLEN et al. 1998; BATTAGLIA & GALLARATE, 2012). As SLN combinaram as vantagens dos carreadores tradicionais, sem as desvantagens de problemas com a escalabilidade ou com a presença de solvente orgânico residual (MÜLLER et al. 2000). São sistemas versáteis, que podem ser utilizados em várias vias de administração (intravenosa, oral, intramuscular, tópica/transdérmica, intranasal, retal, intra-ocular, intraperitoneal). Elas utilizam excipientes biocompatíveis, seguros e com citotoxicidade reduzida (MÜLLER et al., 1996). O maior atrativo das SLN para as indústrias cosmética e farmacêutica deve-se ao fato delas apresentarem grande potencial para liberação sustentada de medicamentos, fácil escalonamento e baixo custo (PUGLIA et al., 2011; BATTAGLIA & GALLARATE, 2012; BELOQUI et al., 2016).

Os surfactantes não iônicos, como copolímeros de bloco, são utilizados para estabilizar estericamente estas partículas. Apesar das propriedades vantajosas das SLN, a limitação do seu uso deve-se ao fato do fármaco ser expulso durante o armazenamento, a curta estabilidade e relativa baixa eficiência de encapsulação são causadas pela pouca solubilidade dos fármacos no lipídio sólido (SCHWARZ & MEHNERT, 1997; FREITAS & MÜLLER, 1999).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), segunda geração das nanopartículas lipídicas, foram desenvolvidas a fim de superar as limitações das SLN (MÜLLER et al. 2011). A inovação deste carreador é gerada pela adição de um lipídio líquido para formar a mistura de lipídios que são responsáveis por compor o interior da nanopartícula. A presença do lipídio líquido (óleo), em temperatura ambiente, nestes carreadores, melhora principalmente a eficiência de encapsulação e impede a expulsão do fármaco das nanopartículas durante o armazenamento, devido à redução da cristalinidade da matriz lipídica em relação às SLN (SAUPE et al., 2005).

As imperfeições da matriz lipídica dos NLC são uma característica deste sistema (em comparação com as SLN), pois permite a criação de “espaços” que irão armazenar uma elevada quantidade de substâncias ativas (SAUPE et al. 2006).

Shah e colaboradores (2017) propuseram 3 modelos para descrição dos NLC: “NLC imperfeito”, o primeiro, composto por uma mistura de glicerídeos formados por diferentes ácidos graxos, gerando estruturas cristalinas imperfeitas (Figura 7A). A eficiência de encapsulamento é aumentada por causa do maior “espaço” criado para acomodar o fármaco. O segundo modelo, chamado de “NLC amorfo”, corresponde a uma mistura de lipídios sólidos e líquidos (óleo), gerando partículas em estado sólido amorfo, o que previne a expulsão do ativo durante o armazenamento, possibilitando o aumento da eficiência de encapsulação de

moléculas lipofílicas (Figura 7B). No terceiro modelo, conhecido como “NLC múltiplo”, há uma dispersão de óleo em lipídio sólido (Figura 7C). A solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é ultrapassada, o que leva à separação de fases e, consequentemente, a formação de nanocompartimentos de óleo no interior da matriz lipídica sólida (SHAH et al., 2017).

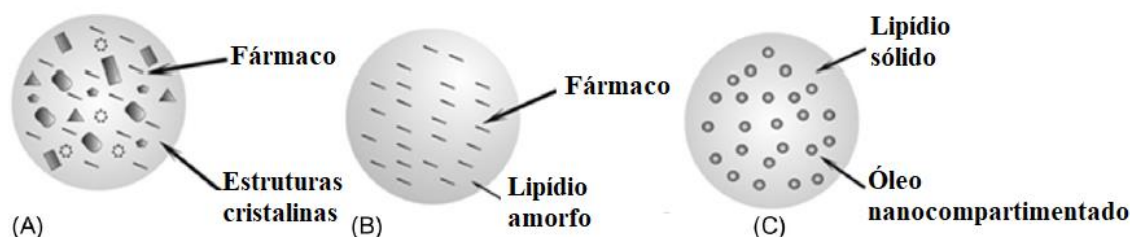


Figura 7: NLC imperfeita (A); NLC amorfa (B); múltipla NLC (C) (adaptado de SHAH et al., 2017).

Ambos os sistemas, SLN e NLC, foram considerados como “*nanosseguros*”, por causa, principalmente, de suas características de baixa toxicidade dérmica (PARDEIKE et al., 2009), menor irritabilidade no local de aplicação em comparação com as formulações tradicionais e excelente tolerabilidade (MÜLLER et al., 2002; PAWAR & BABU, 2010; BATTAGLIA & GALLARATE, 2012). Em trabalhos publicados entre 1999 e 2009, foi demonstrado que as nanopartículas lipídicas, em relação às nanoemulsões, foram capazes de maximizar a permeabilidade de fármacos e elevar o grau de hidratação da pele *in vivo* (PARDEIKE et al., 2009).

O estudo de Pathak e Nagarsenker (2009) demonstrou o uso dos lipídios Compritol®, Precirol® ATO5 e Miglyol®, para encapsular lidocaína em NLC. Puglia e col. (2011) encapsularam os anestésicos locais benzocaína e lidocaína em NLC preparados com os lipídios Compritol® e o surfactante Lutrol®. Ambos os trabalhos, demonstraram a alta eficiência de encapsulação dos anestésicos locais nos NLC, com redução da quantidade liberada *in vitro* em relação ao fármaco não encapsulado (PATHAK & NAGARSENKER, 2009; PUGLIA et al., 2011).

Em nosso grupo de pesquisa, Barbosa e col. (2018) e Castro e col. (2016), através do teste de analgesia (*tail flick*), contendo formulações de NLC com os seguintes componentes: miristato de miristila/palmitato de cetila e Mygliol® e os AL, dibucaína e tetracaína, respectivamente, demonstraram o aumento significativo do tempo de anestesia em comparação ao anestésico livre.

Ribeiro e col. (2017) produziram NLC utilizando lipídios naturais encapsulando lidocaína. A formulação produzida aumentou o tempo de anestesia em relação à lidocaína livre no teste de pressão da pata (*Pain Withdraw Paw Test*, PWPT) em camundongos, demonstrando a eficácia dos NLC como carreadores para a entrega de AL.

Rodrigues da Silva e col. (2017), através do teste de analgesia (PWPT) em animais, demonstraram que o tempo de anestesia do AL, bupivacaína em excesso enantiomérico (S75:R25) encapsulada em NLC, contendo os componentes palmitato de cetila e Capryol®90, foi duplicado. O sistema permitiu ainda a redução de quatro vezes a dose de AL necessária para se obter o mesmo tempo de anestesia do fármaco livre (em solução).

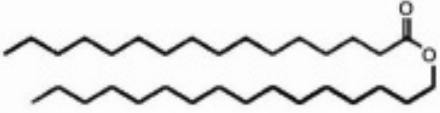
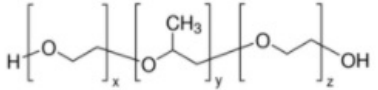
1.4.2 Composição lipídica dos NLC

A seleção dos componentes da mistura lipídica para preparação das NLC é determinante para o êxito da formulação, principalmente, no que diz respeito as características físico-químicas que influenciam na estabilidade da preparação, na eficiência de encapsulação do fármaco e na proteção contra degradação de fármacos sensíveis a agentes externos (oxidação, hidrólise) (TAMJIDI et al., 2013). A solubilidade do fármaco na mistura lipídica está intimamente ligada a eficiência de incorporação do mesmo pelas nanopartículas.

As características dos componentes lipídicos são elementos importantes na produção das nanopartículas lipídicas (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). Geralmente, ácidos graxos livres, álcoois graxos, ésteres de glicerol e ceras são utilizados. São incluídos também os fosfolipídios, glicolipídios e esfingolipídios. Entre os lipídios líquidos, os ácidos oleicos e triglicerídeos caprílico/cáprico estão entre os mais comumente utilizados (GORDILLO-GALEANO & MORA-HUERTAS, 2018). Os lipídios líquidos, triglicerídeos de cadeia média, são muito utilizados pois apresentam baixa viscosidade, propriedades emulsificantes e estabilidade frente a oxidação.

Neste trabalho, uma formulação foi desenvolvida contendo o lipídio sólido (palmitato de cetila), o lipídio líquido (Capmul® PG-8 NF) e o tensoativo (Pluronic® F68), cujas estruturas e características estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Propriedades dos excipientes das NLC empregados nesta dissertação.

Nome do composto	Estrutura química	Massa molar (g/mol)	Temperatura de fusão
Palmitato de cetila		480,85	54°C
Capmul® PG8-NF (propilenoglicol monocaprilato)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OCCH}_2(\text{CH}_2)_w\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	202,29	-
Pluronic® P68		± 8350	54-57°C

w = 5 ou 7; x = 76; y = 29; z = 76

1.4.2.1 Palmitato de Cetila

O palmitato de cetila (CP) é uma cera sintética que apresenta uma mistura de ésteres de ácidos graxos saturados e álcoois, contendo cadeia carbônica de 14 a 18 carbonos, pertencente à classe dos cetil ésteres. A composição e propriedades deste composto são semelhantes às ceras naturais presentes no espermacete de baleia (WENNINGER et al. 1995), sendo usados como agentes emolientes/condicionantes em mais de 200 formulações farmacêuticas e cosméticas, em concentrações acima de 7%.

O palmitato de cetila, estearato de cetila, miristato de miristila, miristato de cetila e o estearil estearato são os ésteres mais comuns nestas ceras. Seu uso indicado em formulações farmacêuticas deve-se ao fato destes compostos não apresentarem toxicidade sistêmica, sensibilização ou fotossensibilização (ELDER, 1982).

A utilização do palmitato de cetila como componente das nanopartículas lipídicas é frequente. Em seu trabalho, Müller (2000), utilizando o AL, tetracaína, comprovou a eficiência de encapsulação e estabilidade de SLN, tendo o CP como componente. Em 2017, SHOVIANTARI et al. demonstraram o aumento da permeação na pele de Coenzima Q10, encapsulada em NLC utilizando azeite de oliva e CP. Em 2020, Rodrigues da Silva e col., demonstrou a melhora da atividade anestésica e anti-inflamatória do anestésico articaína em

Zebrafish em formulação de NLC contendo palmitato de cetila, óleo de copaíba e Tween®80 (RODRIGUES DA SILVA et al., 2020).

1.4.2.2 Capmul® PG-8 NF

Capmul® PG-8 NF é um Propilenoglicol Monocaprilato Tipo II, um monoéster de ácido caprílico com propilenoglicol, da empresa Abitec Corp. É um excelente solvente e ótimo potencializador de biodisponibilidade para fármacos muito complexos e pouco solúveis. O Capmul® PG-8 NF é bastante usado como carreador em capsulas gelatinosas macias e duras e como potencializador de permeação em sistemas de liberação de fármacos transdérmicos. Trabalhos envolvendo a utilização deste lipídio líquido em NLC não foram encontrados.

Há relatos na literatura do uso deste composto em outros sistemas de liberação sustentada. THIMMARAJU et al. (2013), demonstraram que o Capmul® PG8-NF juntamente com Pluronic P68 e Labrafil M2130CS apresentaram nanoemulsões contendo rosuvastatina cálcica estáveis. Em seu trabalho Sunkavalli e col. 2016, avaliaram o perfil de solubilidade deste componente em preparo de sistema de liberação sustentada auto-nanoemulsificante líquido de docetaxel demonstrando melhora na biodisponibilidade oral para tratamento de câncer oral (SUNKAVALLI et al., 2016).

1.4.2.3 Pluronic® P68

Pluronic® F68, produto da empresa Sigma, descreve uma classe de copolímeros de bloco não iônicos, também conhecidos como “poloxamers”, nome este dado por seu inventor Irving Schmolka (1973). Outros nomes comerciais relacionados aos poloxamers são Synperonics (Croda) ou Lutrol® (BASF). Eles apresentam uma cadeia central hidrofóbica de polioxipropileno ligados a duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno.

Os poloxamers têm propriedade surfactante devido sua estrutura anfifílica, sendo utilizado em várias aplicações industriais. Eles permitem aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas ou potencializar a miscibilidade de duas substâncias com diferentes hidrofobicidades. Dessa forma, tendo seu uso aprovado pela FDA, são empregados em produtos farmacêuticos e cosméticos (CHIAPPETTA & SOSNIK, 2007).

O Pluronic® F68 (poloxamer 188), surfactante anfifílico aprovado pelo FDA para uso humano há mais de 50 anos, utilizado no preparo dos NLC deste trabalho, é solúvel em uma variedade de solventes aquosos e orgânicos. Ele possui várias aplicações nas áreas industrial, farmacêutica e cosmética, por causa de suas propriedades surfactante e anfifílica, que lhe possibilita interagir com membranas lipídicas (MOLOUGHNEY et al., 2012; WANG et al., 2017).

Doses excessivas de benzocaína ou pequenos intervalos entre as aplicações podem resultar em reações adversas. A eficácia demonstrada na utilização dos NLC nos sistemas de liberação sustentada de fármacos justifica o desenvolvimento de uma preparação contendo o fármaco em questão, no intuito de prorrogar a ação terapêutica e reduzir os efeitos adversos do uso excessivo deste anestésico local.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e realizar a caracterização físico-química de uma formulação anestésica contendo benzocaína encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados, visando potencializar a atividade terapêutica e a reduzir os efeitos tóxicos após a administração tópica.

2.2 Objetivos específicos

- Otimização de uma formulação anestésica de NLC contendo benzocaína, utilizando planejamento fatorial;
- Caracterização físico-química dos NLC, avaliando a estrutura das partículas e interações/distribuição do fármaco nas mesmas, por diferentes metodologias;
- Avaliação da estabilidade da formulação de NLC otimizada;
- Análise do perfil de liberação *in vitro* da BZC livre e encapsulada em NLC (NLC_{BZC});
- Preparo de gel a base de Carbopol® (gel) para incorporação da formulação otimizada de NLC contendo benzocaína;
- Avaliação farmacológica da NLC_{BZC} incorporada em gel, através do teste de anestesia tópica em animais (*tail flick*);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

- Palmitato de Cetila (Dhaymers Química Fina, Brasil),
- Pluronic® F68 (Sigma Chem. Co., EUA),
- Capmul®PG8-NF (Propylene Glycol Caprylate Type II) (Abitec Corp., EUA),
- Benzocaína (Sigma-Aldrich, EUA);
- Benzotop® - Gel comercial de benzocaína a 20% (DFL Ind. Com. Ltda);
- Metanol (Merck Millipore, Alemanha);
- Acetato de uranila
- Polímero Carboxivinílico (Carbopol®) (Galena Química e Farmacêutica);
- Propilenoglicol (Labsynth Ltda);
- Glicerina (Labsynth Ltda);
- Trietanolamina (Labsynth Ltda);

3.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (Waters® Barueri, Brasil)
- Ultraturrax (T18 basic, IKA Work, Brasil)
- Ultra-sonicador de ponta (Vibracell, Sonics e Materials Inc, EUA), 20 kHz
- Analisador de partículas por espalhamento de luz dinâmico ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido)
- Analisador por rastreamento de partículas NS300 (NanoSight, Reino Unido)
- Centrífuga (MC 12 V, Thermo Scientific, EUA)
- Centrífuga de tubos Falcon (Quimis, Brasil)
- Banho de ultrassom (Thornton T14, Brasil)
- Medidor de pH (Modelo 300M, Analyser Instrumentação Analítica, Brasil)

- Analgesímetro de *tail flick*, com lâmpada projetora de 150W (Onda Científica Ltda., Brasil)
- Liofilizador (Labconco, Freeze dry System/Freezone 4,5, EUA)
- Microscópio eletrônico de transmissão Zeiss® LEO 906 (Zeiss, Freiburg, Alemanha) (Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp)
- Microscópio eletrônico de transmissão JEOL-1400 PLUS (Thermo Fischer Scientific, EUA) - Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM, Campinas)
- Calorímetro Diferencial de Varredura (Modelo 2910, TA Instruments, EUA)
- Difratorômetro (XRD7000, Shimadzu, Japão)
- Instrumento SANS/V16, no Department Quantum Phenomena in Novel Materials Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH, Berlim, Alemanha

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Quantificação de BZC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e validação da metodologia de quantificação

A validação de métodos analíticos é primordial, uma vez que visa garantir a confiabilidade dos dados experimentais (LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004; MORAES et al., 2008; SALAS et al., 2008; GRILLO et al., 2009).

O Guia para validação de métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Internacional Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Human Use (ICH, 2005) foram examinados, no intuito de guiar a validação do método de quantificação de BZC por CLAE. O objetivo da validação é certificar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e garantir que o mesmo cumpra as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

As condições cromatográficas para metodologia analítica de quantificação são dadas na tabela 2, e foram adaptadas de PÉREZ-LOZANO et al., 2005 e MEREY & ZAAZAA, 2014.

Tabela 2. Condições cromatográficas para quantificação de BZC.

Coluna	Luna® 5e C18 100x250 x 4,6mm
Fase Móvel	Metanol:H ₂ O 70:30 (v/v)
pH	4,0
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	284 nm

A validação do método analítico foi feita através da análise dos seguintes parâmetros: precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, especificidade, linearidade e sensibilidade.

A linearidade do método foi estabelecida no intuito de demonstrar que os dados obtidos estavam equivalentes à concentração de BZC na amostra, no intervalo especificado. Cinco concentrações distintas, medidas em triplicata e em três dias consecutivos, foram usadas para obtenção da curva analítica sendo o cálculo de regressão linear feito pelo método dos mínimos quadrados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A precisão, determina a capacidade em fornecer resultados repetitivos e consistentes, foi avaliada em testes interdia, e os resultados expressos em Desvio Padrão Relativo (DPR), cujo valor deve ser menor que 5% (ANVISA, 2003), conforme Equação 1.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} * 100$$

Equação 1

onde DP é o Desvio Padrão e CMD a concentração média determinada.

A concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação é conhecida como repetibilidade (ou precisão intra-corrida). A concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, é referida como precisão intermediária (ou precisão inter-corridas) (ANVISA, 2003).

A proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor real define a exatidão de um método analítico. Após o estabelecimento da linearidade e da especificidade do método analítico, determina-se sua exatidão, a partir de - no mínimo - nove determinações, sendo contemplado o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas de cada. A exatidão (E) foi obtida através da equação 2, que relaciona a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica (CT) (ANVISA, 2003).

$$E = \frac{CMD}{CT} \times 100$$

Equação 2

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando-se as equações 3 e 4, respectivamente. LD refere-se à menor quantidade do analito (BZC) que pode ser detectado em uma amostra, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

Equação 3

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Equação 4

onde DP é o desvio padrão (intercepto com o eixo y) e IC é a inclinação da curva analítica média. Através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, pode-se mensurar o limite de detecção. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra a ser determinada com precisão e exatidão admissíveis sob as condições experimentais já determinadas.

3.2.2 Seleção dos lipídios

Os lipídios correspondem aos principais ingredientes dos NLC, pois possuem a capacidade de influenciar a eficiência de encapsulação, a capacidade de carga do fármaco, a estabilidade e o perfil de liberação sustentada das formulações (JOSHI & PATRAVALE, 2008; SHAH et al., 2015). A seleção dos lipídios mais adequados para formar a matriz lipídica, considerando a capacidade de solubilizar o fármaco, é um dos parâmetros essenciais para desenvolver dispersões de NLC (MENDES et al., 2013). Para os testes preliminares da formulação foram avaliados os lipídios sólidos: Apfil®, cera de abelha branca e palmitato de cetila; os lipídios líquidos: Labrasol®, Labrafil® e Capmul® PG8-NF. Em todas as formulações a concentração de BZC foi de 2%, e o surfactante de escolha foi o Pluronic® P68, usado à 5%.

3.2.3 Preparo dos NLC contendo benzocaína

Os NLC foram preparados pelo método de homogeneização por ultrasonicação. Nesse procedimento, o lipídio sólido (SL) foi aquecido 10 °C acima do seu ponto de fusão, seguindo-se adição do lipídio líquido (LL) ao mesmo (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007). Em seguida, uma porção pré-determinada do fármaco (BZC) foi adicionada (sob constante agitação magnética) até completa solubilização do ativo na fase oleosa. Posteriormente, para formação da pré-emulsão (O/A), junto a fase oleosa foi adicionado um volume adequado de solução aquosa contendo o surfactante Pluronic® P68, na mesma temperatura – 10 °C acima do ponto de fusão do SL, sob agitação de 3.000 rpm, por 3 min em Ultra-Turrax. A pré-emulsão formada neste processo, mantida sob aquecimento, foi rapidamente levada ao sonicador de ponta, em

potência de 60W, 20kHz de frequência nominal em ciclos de 30 s (ligado/desligado) durante 30 min, mantida sob aquecimento constante. Em seguida a nanoemulsão obtida foi resfriada rapidamente em banho de gelo até atingir a temperatura de 25 °C. Ao final das preparações, todas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente para caracterizações posteriores.

3.2.4 Otimização das NLC por planejamento fatorial

Realizou-se um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, utilizando o software *Design Expert*® (versão 12.0.1.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA), no intuito de otimizar uma formulação de NLC. A significância da regressão foi determinada por análise da variância (ANOVA, com nível de confiança de 95%).

3.2.5 Caracterização físico-química dos NLC

3.2.5.1 Medida de Tamanho e índice de polidispersão (PDI)

O tamanho médio das nanopartículas, assim como o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz dinâmico - DLS (*dynamic light scattering*). As leituras de intensidade foram feitas em triplicata, realizando a diluição da dispersão das nanopartículas em água desionizada (Milli-Q) em 100 vezes, à temperatura de 25°C, utilizando cubetas de poliestireno (10 mm de caminho óptico). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.5.2 Medidas de potencial zeta

Utilizando o equipamento Zetasizer ZS90, foi determinado o potencial zeta (ZP) por microeletroforese Doppler a laser. Segundo LOWRY et al. (2016), um campo elétrico é aplicado a uma dispersão de partículas, que começam a se mover com velocidade relacionada ao seu potencial elétrico de superfície. Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser, chamada M3 PALS (espalhamento de luz com análise de fases).

Através dela, é possível realizar o cálculo da mobilidade eletroforética e, a partir desta deduzir o valor de ZP e sua distribuição. As leituras foram feitas em triplicata, após realizar a diluição das suspensões de NLC em água Milli-Q (1:1000 em água desionizada) em cubetas apropriadas, de poliestireno, à temperatura de 25 °C. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.5.3 Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA)

Através do equipamento NanoSight NS300 com software NTA 3.1 Analytical, foram realizadas as medidas de NTA, que tinha por objetivo caracterizar o tamanho, distribuição, intensidade e concentração das nanopartículas em suspensão (FILIPE et al., 2010). O equipamento utiliza um vídeo-microscópio para avaliar as propriedades de espalhamento de luz e o movimento browniano de partículas em suspensão, possibilitando a medição do diâmetro médio, a polidispersão (Span) e a concentração das mesmas, em amostras em suspensão líquida.

As leituras foram feitas em triplicata, após diluição das amostras em água Milli-Q (1:250.000, v/v). As amostras foram colocadas no interior do porta-amostras por meio de uma seringa esterilizada, até seu total preenchimento (0,5 mL). As amostras foram submetidas a um feixe de laser verde ($\lambda = 532$ nm), a 25°C. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

Os dados obtidos foram avaliados quanto o diâmetro das partículas na distribuição de 10%, 50% e 90% da população de partículas, para cálculo dos valores de Span e concentração de partículas por mL. As medidas de diâmetro foram expressas pelo diâmetro médio ponderado em volume (d), diâmetro ao nível do percentil 10 da curva de distribuição de tamanho [d (0,1 ou 10%)], diâmetro no percentil 50 (mediana) da curva de distribuição de tamanho [d (0,5 ou 50%)] e diâmetro ao nível do percentil 90 da curva de distribuição de tamanho [d (0,9 ou 90%)] calculado em volume (v) e pelo número (n) de partículas. O valor de Span, calculado utilizando a equação 5, avaliou a polidispersão. Os resultados obtidos representam a média de três determinações para cada lote (TEERANACHAIDEKUL et al., 2007; BIANCHIN et al., 2015).

$$SPAN = \frac{d90\% - d10\%}{d50\%}$$

3.2.5.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

Com o pHmetro previamente calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0, foram avaliadas as alterações de pH das formulações durante a estocagem. As leituras foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.5.5 Determinação do teor de BZC nas nanopartículas

Para determinação do teor de BZC nas formulações, foi retirado 50 μ L da amostra, dissolvida em 1950 μ L de metanol e colocada em banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, realizou-se centrifugação refrigerada a 4100g, por 20 min. A partir dos sobrenadantes, coletou-se alíquotas de 100 μ L que foram diluídas em 1900 μ L de fase móvel, e posteriormente analisadas por CLAE, segundo o método validado.

3.2.5.6 Eficiência de encapsulação e capacidade de armazenamento

O método de ultrafiltração-centrifugação foi utilizado para determinar a eficiência de encapsulação da BZC nas formulações de NLC (MÜLLER et al. 2002). Inicialmente, 50 μ L das amostras de NLC foram diluídos em 1950 μ L de água desionizada e homogeneizados. Em seguida, transferiu-se alíquotas de 0,4 mL da amostra para uma unidade de filtração de 10 kDa (Millex, Millipore) acoplada a tubos tipo Eppendorf e levadas a centrifugação refrigerada por 20 min a 4100 g. A solução filtrada foi coletada e a quantidade de fármaco livre (BZC_{livre}) quantificada por CLAE, de acordo com o método validado. A porcentagem de eficiência de encapsulação (%EE) do anestésico foi calculada, conforme a equação 6.

$$EE\% = \frac{BZC_{\text{total}} - BZC_{\text{livre}}}{BZC_{\text{total}}} \times 100$$

Equação 6

onde: BZC_{total} corresponde à quantidade total de benzocaína na suspensão de NLC.

Alternativamente, a quantidade de BZC encapsulada nas nanopartículas foi expressa pela capacidade de armazenamento dos NLC (*drug loading*, %DL), conforme a equação 7 (CHEN et al., 2015; NAHAK et al., 2015).

$$\% DL = \frac{\text{peso BZC encapsulada}}{\text{peso total lipídios (NLC)}} \times 100$$

Equação 7

3.2.5.7 Microscopia eletrônica de transmissão

As análises morfológicas dos NLC foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nesta técnica, uma gota de cada amostra de NLC, contendo ou não BZC, foi adicionada ao *grid* de cobre com 200 Mesh. O excesso da amostra foi retirado e, em seguida, uma gota de solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m) foi adicionada sobre a mesma com intuito de melhorar o contraste das imagens. O excesso foi novamente retirado e, na sequência, uma gota de água Milli-Q foi adicionada à grade, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, 5 s depois. As amostras permaneceram em repouso por 4 horas em temperatura ambiente após o preparo das mesmas nas grades, até a completa secagem.

3.2.5.8 Criomicroscopia eletrônica

As leituras de Cryo-TEM ou *Cryo-Transmission electron cryomicroscopy* foram feitas com ajuda da doutoranda L.D. Moura no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) no CNPEM em Campinas, São Paulo. Nesta técnica, foi utilizado uma grade de malha Holey Lacey de 300 mesh de Ted Pella®. As grades foram submetidas a um procedimento de descarga luminosa (sistema de descarga Pelco easiGlow-Ted Pella, EUA) de 15 mA por 10 s, para torná-las mais hidrofílicas. Em seguida, as grades foram colocadas em um Vitrobot® (Mark IV, Thermo Fischer Scientific, EUA), onde 3 µL de amostra foram adicionados, e deixados por 20 s para que a amostra se fixasse. Posteriormente, foi realizada transferência automática (2-3 s) para haver a secagem do excesso de amostra com uma força de transferência negativa (força de blot). Por fim, a grade foi mergulhada rapidamente em etanol líquido, envolvido por um ambiente de nitrogênio líquido. As leituras foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL-1400 PLUS a 120 Kv, utilizando o software TEM Center for JEM 1400 Plus

para obtenção das micrografias eletrônicas. Para o tratamento das imagens obtidas, o software Gatan Digital Micrograph™ (GATAN, EUA) foi utilizado.

3.2.5.9 Calorimetria diferencial exploratória

Os termogramas de Calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram obtidos em um Calorímetro Diferencial de Varredura em porta-amostra padrão, seladas, de alumínio e analisadas com o programa *Thermal Solutions v.1.25*. Antes das análises, realizou-se a liofilização das amostras de NLC, com e sem benzocaína. As amostras da mistura física, com e sem fármaco, dos componentes utilizados na formulação foram previamente preparadas nas mesmas concentrações das utilizadas na preparação da NLC. O índice de aquecimento foi de 10°C.min⁻¹, de 30 a 200 °C. Outro parâmetro que se pode retirar das análises de DSC é o índice de cristalinidade. Ele permite avaliar o efeito da adição dos componentes à matriz lipídica. A cristalinidade geralmente é comparada com aquela do sistema livre de fármaco (controle) que, neste caso, refere-se ao lipídio sólido (CP), considerando-o como referência (100% de cristalinidade). O índice de cristalinidade (IC, %) foi calculado de acordo com a equação 8 (NAHAK et al., 2015):

$$IC\% = \frac{\Delta H (J/g)_{nanopartícula}}{\Delta H (J/g)_{lipídio} \cdot concentração da fase lipídica} \times 100$$

Equação 8

Para realizar a avaliação das interações intermoleculares, o estudo termodinâmico utilizou o método da minimização da energia de Gibbs. Esse método se baseia no princípio de que o sistema reacional a temperatura e pressão constantes se processa de forma a obter a mínima energia livre de Gibbs total do sistema em busca de atingir o equilíbrio termodinâmico, ou seja, o ponto de equilíbrio é representado pelo valor mínimo da energia de Gibbs (SMITH et al. 2011).

Quando o estado de equilíbrio é atingido, não há mais alterações e o sistema continua a existir neste estado a temperatura e pressão constantes, sem ter influência sobre como esse estado foi, de forma efetiva, atingido (SMITH, et al, 2011).

A energia livre de Gibbs foi calculada de acordo com a equação 9.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Equação 9

onde ΔH corresponde a variação da entalpia, T a temperatura e ΔS , nível de desorganização dos átomos.

3.2.5.10 Difração de Raio-X

Com as amostras de NLC e NLC_{BZC} liofilizadas e a mistura física dos componentes da formulação na mesma concentração da formulação otimizada, realizou-se as análises de difração de raios-X (XDR) no difratômetro Shimadzu XRD7000, utilizando fonte de Cu-K α , com varredura de 1°.min⁻¹, entre os valores de 2 θ de 5 e 50°.

3.2.5.11 Difração de Nêutrons

As medidas da difração de nêutrons (SANS) foram feitas em colaboração com os Dr. Fabiano Yokaichia e Margareth Franco, no instrumento V16, no Department Quantum Phenomena in Novel Materials Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH, Berlin, Alemanha. Foi empregado o método de tempo de voo (TOF) que trabalha com um amplo espectro de nêutrons e cujo comprimento de onda é proporcional aos respectivos valores de TOF. O TOF é definido como o tempo que um dado nêutron precisa para passar de uma determinada posição, para o detector (VOGTT et al., 2014).

Os dados foram registrados em duas distâncias no detector de amostras: 1.7 m com comprimento de onda de nêutrons de 1.8 – 3.8 Å e a 11 m, com comprimento de onda de nêutrons de 1.6 a 9.2 Å. As amostras foram colocadas em cubetas Hellma 110Qs e ajustadas no porta-amostra, com 20 posições disponíveis para medição. Para garantir a estabilidade da temperatura da amostra, um tempo de espera de 30 minutos entre as medidas foi adotado. As amostras das formulações otimizadas de NLC, contendo 25% de concentração lipídio total, na proporção 60:40 (sólido:líquido), 5% de Pluronic®P68 e BZC 3% e seu controle, foram previamente preparadas em D₂O e medidas nas temperaturas de 25, 37 e 40°C. Correções para a transmissão da amostra, contagens do detector de fundo, espalhamento da célula vazia e eficiência do detector foram incluídas no final da redução de dados. Os dados de SANS foram radialmente calculados e combinados, para se obter um intervalo total de Q : 0,005 – 0,5 Å⁻¹

(VOGTT et al., 2014). Para modelar os dados de SANS e interpretar as medidas de NLC, aplicamos a forma de função empírica mostrada na Equação 10:

$$I(q) = \frac{A}{q^n} + \frac{B}{1 + (q\xi_1)^m} + back$$

Equação 10

onde, A e B são constantes, n e m são índices da lei de potência, *back* é o fundo incoerente e ξ_1 é o comprimento da correlação (ASADUJJAMAN et al., 2017; HAMMOUDA et al., 2002). O primeiro termo na equação é uma queda da lei de potência, conhecido como espalhamento Porod, que descreve o espalhamento de aglomerados ou agregados (contribuição do agregado) no sistema. O segundo termo é a função Lorentziana, que corresponde ao espalhamento das interações hidrofóbicas entre os lipídios em solução no “core” (contribuição da associação) e o parâmetro chave é a correlação das ondas ξ_1 .

3.2.6 Ensaio de cinética de liberação *in vitro* da BZC

Utilizou-se células de difusão vertical do tipo Franz (área de permeação 0,6 cm²) para os ensaios de cinética de liberação *in vitro*. Conforme demonstrado na Figura 8, uma célula de Franz é formada por duas partes: o compartimento doador e o receptor. No compartimento doador, a formulação de NLC_{BZC} e o fármaco livre, dissolvido em solução de propilenoglicol e água desionizada (70:30 v:v) na concentração de BZC de 3%, foram adicionadas e, apenas o fármaco atravessa membrana chegando ao compartimento receptor. Uma membrana de policarbonato (diâmetro 19 mm, poro de exclusão molecular de 100 nanômetros, Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman®) foi utilizada como modelo de barreira, para separar a amostra (0,1 mL no compartimento doador) do compartimento acceptor contendo aproximadamente 15 mL da solução de propilenoglicol e água desionizada (70:30 v:v), com o objetivo de garantir a condição sink ao longo do estudo de liberação. Sob leve agitação (400 rpm) e temperatura constante por todo o período de experimento (37°C), a solução do compartimento acceptor foi mantida. 0,2 mL de amostra eram retirados do compartimento acceptor em intervalos padronizados (volume total repostado com adição da solução) até completa liberação da BZC. As amostras foram quantificadas por CLAE.

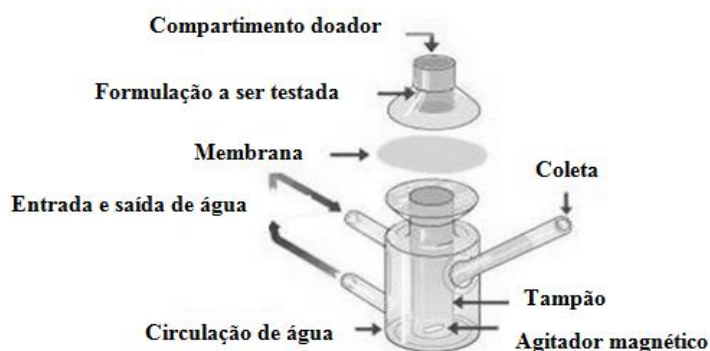


Figura 8. Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.

Para analisar as curvas de liberação, utilizou-se o software KinetDS 3.0. Diversos modelos matemáticos foram testados no intuito e avaliar o melhor modelo para prever a curva de liberação selecionada a partir do coeficiente de determinação (r^2). Os modelos testados estão descritos nas equações de 11 a 17.

Modelo de ordem zero:

$$Q = k.t + Q_0$$

Equação 11

onde Q é a quantidade de droga liberada, t é o tempo e Q_0 é o valor inicial de Q e k é a constante de liberação.

Modelo de primeira ordem:

$$Q = 100(1 - e^{-kt})$$

Equação 12

Modelo de Higushi:

$$Q = k.t^{0.5}$$

Equação 13

Modelo de Hiscon-Crowell:

$$Q = 100[1 - (1 - k.t)^3]$$

Equação 14

Modelo de Korsmeyer-Peppas:

$$Q=K.t^n$$

Equação 15

onde n = expoente de difusão que indica qual é o mecanismo de liberação.

Modelo de Baker-Lonsdale (aplicável se há uma correlação linear do primeiro termo da equação em função do tempo)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - [1 - k_1 t(t - l)]^n$$

Equação 16

onde M_t e M_∞ à quantidade de fármaco liberado no tempo “t” e no tempo infinito, respectivamente.

Modelo de Weibull

$$Q = 1 - \exp\left[\frac{-(t)b}{a}\right]$$

Equação 17

onde b o expoente da liberação (parâmetro do formato da curva).

3.2.7 Avaliação da estabilidade das formulações

A avaliação da estabilidade das formulações foi feita durante um período de estocagem de 12 meses em temperatura ambiente, analisando o diâmetro médio das partículas, o PDI, o ZP, pH, %EE do anestésico e número de partículas/mL.

3.2.8 Avaliação da atividade antinociceptiva in vivo

3.2.8.1 Preparação de gel de carbopol

Carbopol foi utilizado como matriz de gel para a incorporação dos NLC. O gel base foi preparado de acordo com o procedimento operacional padrão descrito (Figura 9), de acordo com a resolução da RDC 67/2007 da ANVISA (BRASIL, 2007), utilizando os constituintes descritos na tabela 3.

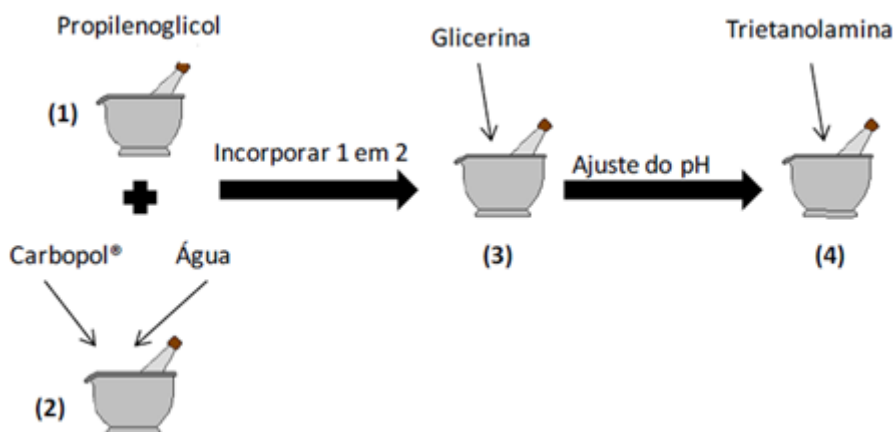


Figura 9. Método de preparo do gel de carbopol base (adaptado de SOBRAL, 2012)

Tabela 3. Componentes utilizados no preparo do gel base (adaptado de SOBRAL, 2012).

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Função</i>
Carbopol®	5%	Agente gelificante de fácil dispersão
Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
Glicerina	0,1%	Conservante
Trietanolamina (TEA)	q.s.p pH 5,0	Agente alcalinizante
Água desionizada	q.s.p. 100mL	Solvente

Primeiramente, incorporou-se polímero carboxivinílico em água deionizada até total intumescimento e, em seguida, adicionou-se propilenoglicol ao polímero já intumescido. Após este procedimento, acrescentou-se a glicerina e, por fim, ajustou-se o pH com TEA (± 20 gotas). O gel de carbopol foi armazenada em frasco plástico devidamente fechado, em temperatura de 4 °C. O propilenoglicol e glicerina, utilizados na concentração de 5% e 0,1% respectivamente nesta formulação, conferiram caráter umectante ao gel, prevenindo a secagem do mesmo e melhorando sua consistência e aplicação na pele (LACHMAN et al., 2001).

3.2.8.2 Avaliação farmacológica in vivo

O teste de “tail flick” foi descrito por D’Amour e Smith (1941), e permite mensurar a latência do movimento da cauda de um animal (ratos ou camundongos) frente a um estímulo térmico focalizado (Figura 10). A partir da década de 1990, a utilização deste teste para avaliar a atividade antinociceptiva de fármacos administradas por diferentes vias foi também aplicado para mensurar anestesia tópica, na região da base da cauda do animal (GRANT et al., 1994; YU et al., 2002).

Na realização do experimento, utilizou-se 35 camundongos albinos Swiss, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB-Unicamp), com peso variando entre 30 e 35g, submetidos a ciclos claro/escuro de 12 h, com água e alimentação a vontade, temperatura ambiente monitorada a 22 ± 3 °C, alojados coletivamente (4 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias. Os animais foram separados de maneira aleatória (n=7) para receber os tratamentos listados na tabela 4. Para tanto, o protocolo experimental foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa-UNICAMP), protocolo nº 5428-1/2019 (Anexo 1).

Tabela 4. Grupos experimentais das formulações para avaliação da atividade antinociceptiva.

Grupo	Formulação
G1	Gel de Benzocaína livre a 1,5%
G2	Gel de NLC _{BZC} a 1,5%
G3	Benzotop® (benzocaína comercial a 20%)
G4	Gel de NLC _{BZC} a 3,0%
G5	Gel de carbopol

O teste de *tail flick* foi utilizado para a determinação da atividade farmacológica das formulações (CEREDA et al., 2016; AKKARI et al, 2016). Os animais foram divididos nos grupos descritos na tabela 3 e antes do início do teste foram colocados em um tubo de acrílico para contenção. Os tubos foram fixados no equipamento de *tail flick* (analgesímetro) com a cauda exposta (5 cm de sua ponta) ao estímulo térmico ($55^\circ \pm 1$ °C) gerado pela lâmpada projetora (de 150 W) do aparelho. No dia anterior ao teste, foram feitas medidas de linha basal de cada animal com observação do tempo de reação (movimento da cauda) frente ao estímulo térmico gerado pelo analgesímetro. O tempo de reação foi gravado com uso de um cronômetro que foi ativado concomitantemente ao estímulo térmico e foi parado quando o animal apresentou movimentação da cauda.

No dia seguinte à determinação do limiar basal, as formulações (0,1 g) foram aplicadas na base da cauda do animal. Depois de 30 min, a base da cauda foi submetida ao estímulo térmico por um tempo de latência de, no máximo, 10 seg (*cut off*), até a reação de movimentação da cauda. O animal foi submetido a esse procedimento de hora em hora, até que o tempo de latência retornasse ao valor da linha basal. Todos os experimentos foram realizados pelo mesmo observador.

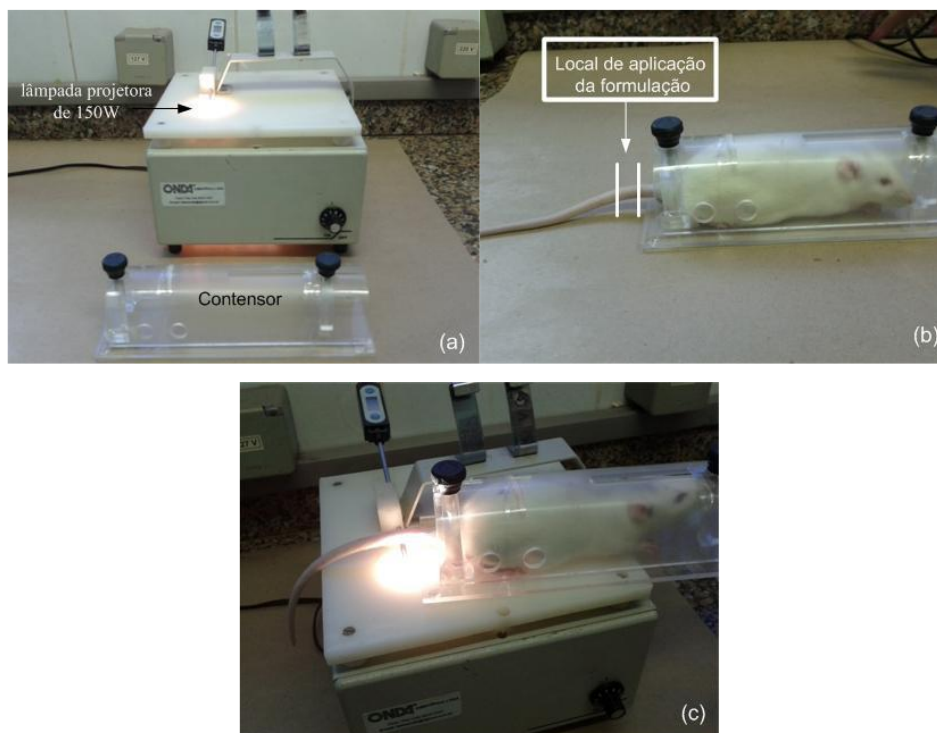


Figura 10. Teste de *tail flick*. (a) Aparatos utilizados durante o teste de analgesia – *tail flick*, (b) Aplicação local das formulações e (c) animal sendo avaliado quanto à latência analgésica.

Os resultados obtidos foram expressos como efeito máximo possível (%EMP), duração do efeito analgésico (min) e área sob a curva de eficácia (ASCE) para cada grupo experimental (de ARAÚJO et al., 2010; CEREDA et al., 2016; AKKARI et al., 2016).

Os resultados foram expressos em número de animais com analgesia em função do tempo, duração da analgesia e porcentagem de efeito antinociceptivo máximo possível (%EMP), calculado de acordo com a equação 18 (YU et al., 2002). Todos os experimentos foram conduzidos pelo mesmo observador.

$$\%EMP = \frac{\text{Tempo de latência-linha basal}}{\text{cut off-linha basal}} \times 100$$

Equação 18

O cálculo da área sob a curva foi extraído dos gráficos de %EMP versus tempo em minutos. As análises estatísticas, utilizando One-Way ANOVA com pós teste de Tukey-Kramer, foram feitas usando o programa *GraphPad Prism*, versão 8.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação de Benzocaína por CLAE

De acordo com o que é preconizado pela Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro e Diretrizes de Produtos Farmacêuticos para Humanos (ICH 2005), o método utilizado para quantificação de BZC por CLAE foi considerado adequado por atender os limites de linearidade, precisão e exatidão.

Baseando-se nas condições cromatográficas descritas, conforme cromatograma na Figura 11, obtivemos a separação cromatográfica de BZC em um tempo de retenção de 4,15 min. Quando injetamos amostras de nanopartículas lipídicas sem o fármaco não foram observados outros picos no mesmo tempo de retenção. Além disso, em demonstração de especificidade da técnica estabelecida, não foi observada qualquer impureza dos componentes.

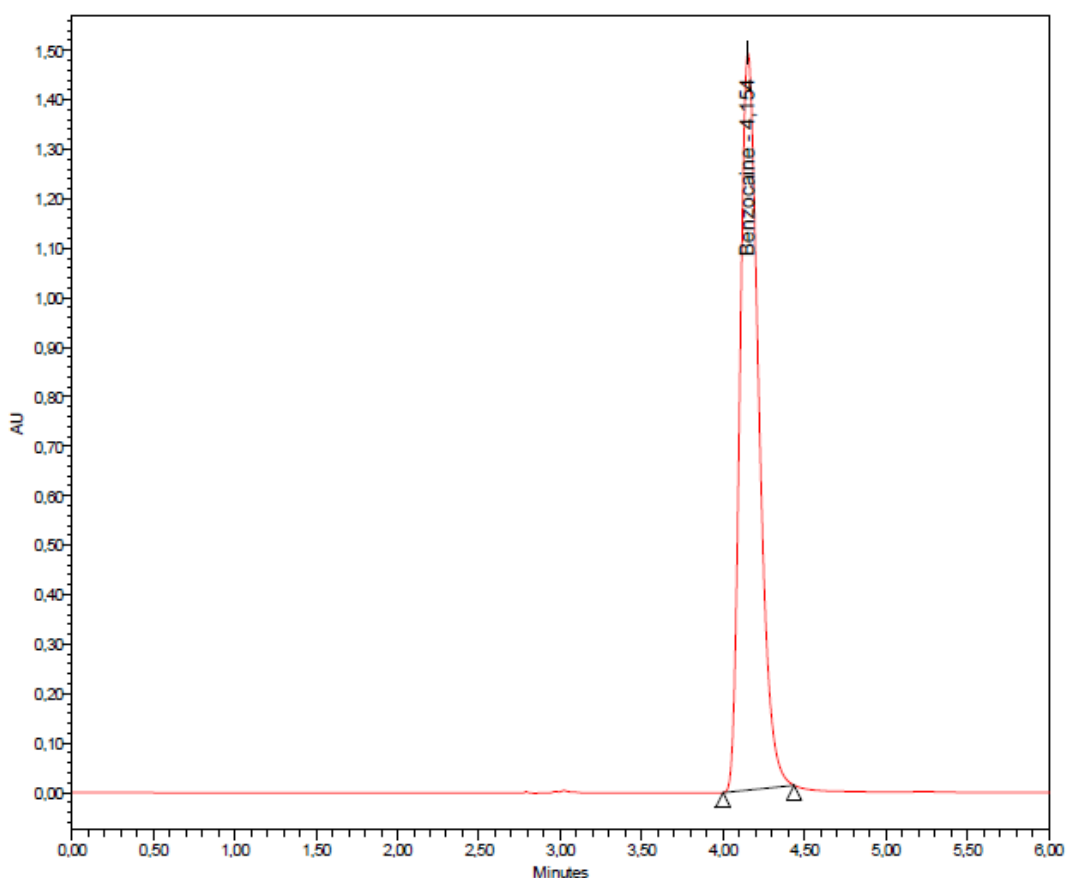


Figura 11. Cromatograma de BZC, detectada a 284 nm, com tempo de retenção em 4,15 min. a 30°C.

Para montagem da curva de calibração (Figura 12), foram preparadas soluções de BZC dissolvidas na fase móvel. As concentrações utilizadas variaram de 0,25 a 37,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com oito pontos. Foi necessário medir curvas analíticas por 3 dias consecutivos, com triplicata de cada ponto da curva (3 por dia) para determinar a linearidade.

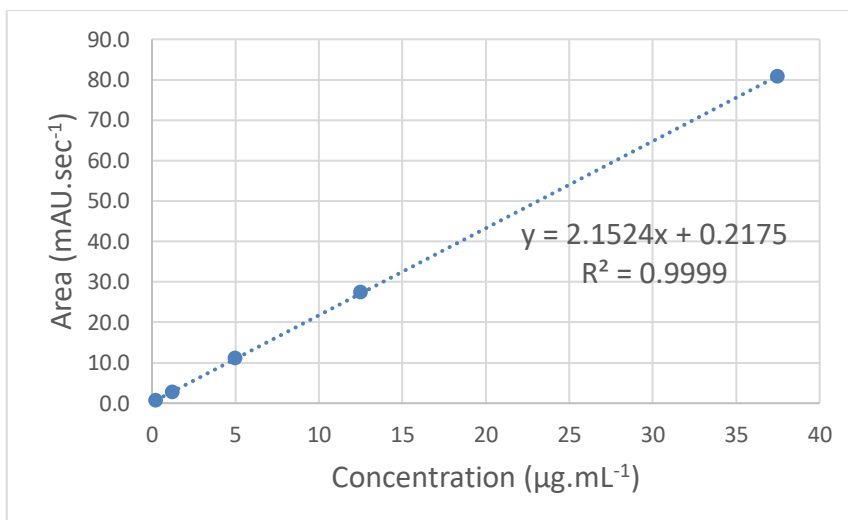


Figura 12. Curva analítica média da BZC, obtida por CLAE, na faixa de concentração de 0,25 a 37,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Equação da reta: $y = 2,1524x + 0,2175$ e $R^2 = 0,9999$.

De acordo com as recomendações da RE 889 (ANVISA, 2003), nos três dias avaliados, os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,999, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Equações da reta e coeficientes de correlação obtidos através das curvas analíticas para quantificação da BZC por CLAE, em três dias consecutivos.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Regressão Linear	$y = 2,154x + 0,1667$	$y = 2,1373x + 0,3813$	$y = 2,145x + 0,0012$
R^2	$R^2 = 1$	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9998$

Segundo as análises, o limite de detecção (LD) de BZC foi de 0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o limite de quantificação (LQ), de 0,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tanto LD quanto LQ de BZC foram calculados de acordo com as equações 3 e 4, e determinados a partir do intercepto e da inclinação da curva analítica.

Em todos os casos, os dados de precisão intra-dia e da precisão inter-dias determinados a partir dos desvios padrão relativos (DPR) foram de $\leq 3\%$, estando de acordo com a regulamentação (ANVISA, 2003), conforme apontado na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR1, DPR2 e DPR3) e inter-dias, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de BZC.

[BZC] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR 1 (%)	DPR 2 (%)	DPR 3 (%)	DPR Inter-dia (%)
0,50	2,02	1,98	2,02	2,00
15,0	0,34	1,27	0,20	0,20
25,0	0,76	0,48	1,05	0,80

Conforme apresentado na Tabela 7, os valores obtidos experimentalmente de BZC foram comparados com os valores teóricos.

Tabela 7. Resultados do teste de precisão. Comparação entre a concentração teórica e as obtidas experimentalmente para BZC, em três dias de experimentos e análise inter-dias.

[BZC] teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[BZC*] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) 1º Dia	[BZC*] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) 2º Dia	[BZC*] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) 3º Dia	[BZC*] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Inter-dias
0,50	0,496 \pm 0,01	0,504 \pm 0,01	0,496 \pm 0,01	0,499 \pm 0,01
15,0	14,86 \pm 0,05	14,91 \pm 0,19	14,86 \pm 0,03	14,88 \pm 0,03
25,0	25,05 \pm 0,19	25,05 \pm 0,12	24,72 \pm 0,26	24,94 \pm 0,20

* Concentração de BZC determinada experimentalmente.

A partir destes dados montamos a Tabela 8 com os dados de recuperação média de três dias consecutivos, apresentando valores entre 98,9 a 100,8%, *ie* de acordo com os limites especificados de 97 – 102% (USP, 2009) e comprovando a exatidão do método. Dessa forma, ao longo do mestrado, realizou-se todas as dosagens do fármaco a partir da curva analítica média obtida.

Tabela 8. Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação de BZC por CLAE.

[BZC teórica] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% recuperado			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dias
0,50	99,2	100,8	99,2	99,8
15,0	99,1	99,4	99,1	99,2
25,0	100,2	100,2	98,9	99,8

4.2 Seleção dos lipídios

Antes de escolher os lipídios a serem utilizados na formulação, realizamos testes preliminares para determinar qual formulação atenderia os seguintes critérios: menores tamanhos de partículas e PDI e maior ZP, em módulo.

Buscamos uma formulação que apresentasse menor tamanho de partículas, para a concentração de anestésico de 2%, pois queríamos partículas menores que pudessem ter maior área de superfície para liberação do fármaco. Para o ZP, era desejável valores maiores em módulo, para garantir maior estabilidade as nanopartículas (HAN et al., 2008). Para avaliar o grau de homogeneidade do sistema, selecionamos dentre os lipídios aqueles que apresentassem o menor índice de polidispersão (PDI), devendo estar na faixa até 0,2, indicando, dessa forma, uma distribuição de partículas monodispersa (MÜLLER et al. 2000).

A escolha da concentração lipídica total, de 20% em peso, e a razão SL:LL (70:30) foi baseada em experimentos prévios do grupo, como sendo aquela capaz de solubilizar a concentração de 2% de BZC. A capacidade de solubilização do fármaco foi analisada para as diferentes misturas lipídicas. Escolheu-se, como surfactante, Pluronic®F68 na concentração de 5%, também de acordo com trabalhos anteriores do grupo. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 9: Resultados preliminares das formulações com diferentes tipos de lipídios.

Formulação	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Apfil®	7%	7%	7%	-	-	-	-	-	-
Cera de abelha branca	-	-	-	7%	7%	7%	-	-	-
Palmitato de cetila	-	-	-	-	-	-	7%	7%	7%
Labrasol®	3%	-	-	3%	-	-	3%	-	-
Labrafil®	-	3%	-	-	3%	-	-	3%	-
Capmul® PG8-NF	-	-	3%	-	-	3%	-	-	3%
Respostas									
Tamanho (nm)	-	-	325,3 ± 1,0	-	-	295,3 ± 1,2	-	288,3 ± 2,1	215,3 ± 0,4
PDI	-	-	0,356 ± 0,056	-	-	0,332 ± 0,229	-	0,432 ± 0,129	0,097 ± 0,029
ZP [mV]	-	-	-16,5 ± 0,1	-	-	-16,9 ± 1,0	-	-18,3 ± 0,7	-31,3 ± 0,6
Aspecto visual	sólido	sólido	líquido	sólido	sólido	líquido	sólido	líquido	Líquido

Depois de preparada as amostras, as formulações foram armazenadas por uma semana para analisar a estabilidade física. Dessa forma, após o tempo de estocagem, a composição selecionada para este estudo foi a dos seguintes componentes: palmitato de cetila (lipídio sólido) e Capmul® PG-8 NF (lipídio líquido). Tal composição apresentou menor tamanho de partícula e PDI e maior valor de ZP, em módulo. No intuito de encontrarmos a melhor proporção da composição lipídica da formulação, realizamos uma otimização por planejamento experimental, como descrito a seguir.

4.3 Otimização das NLC por planejamento experimental

Os lipídios selecionados na análise preliminar (palmitato de cetila – Capmul® PG8-NF) produziram formulações de NLC com respostas satisfatórias. Contudo, as concentrações ideais de cada componente e a influência destes nas propriedades de interesse precisavam ser esclarecidas. Dessa forma, baseando-se no planejamento experimental (DOE, *Design of Experiments*), realizou-se uma análise estatística. Através deste recurso, foi possível encontrar um modelo matemático para representar a influência dos componentes da formulação nas propriedades de interesse, além de suas interações entre si utilizando um número menor de experimentos.

Portanto, encontramos condições que levaram à otimização efetiva do sistema (CARBONE et al., 2012). Para verificar a significância dos efeitos, suas interações e a falta de ajuste do modelo de regressão, utilizou-se a análise da variância (ANOVA) no nível de confiança de 95%.

O programa *Design Expert*® (versão 12.0.1.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) foi utilizado para realizarmos o planejamento experimental mencionado. Como apresentado na tabela 10, elaboramos um planejamento 2^3 , com triplicata no ponto central, avaliando as seguintes variáveis experimentais: concentração lipídica total, razão lipídio sólido: lipídio líquido e benzocaína, em dois níveis (alto e baixo).

Tabela 10: Planejamento fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central, usado para preparo de NLC contendo benzocaína.

Variáveis experimentais	Nível Baixo	Nível Alto	Ponto Central
Concentração lipídica total (m)	15%	25%	20%
Razão lipídio sólido (palmitato de cetila) : lipídio líquido (Capmul®PG8 NF) (m:m)	60:40	80:20	70:30
Benzocaína (% m:m)	1	3	2
Propriedades de interesse	Critérios		
Tamanho de partículas (nm)	Mínimo		
Índice de polidispersão (PDI)	< 0,200		
Potencial Zeta (mV)	> 20		

A partir das respostas satisfatórias obtidas no teste preliminar, ajustou-se o ponto central. Dessa forma, a partir da escolha dos valores, 11 combinações experimentais foram geradas para serem preparadas. Conforme descrito em métodos, as amostras tiveram suas propriedades medidas. Buscamos uma formulação monodispersa que pudesse ser utilizada topicamente, sendo assim, o objetivo foi encontrar uma formulação com os menores tamanho de partículas e PDI (DOKTOROVÁ et. al., 2016). Em relação ao ZP, para garantir nanopartículas com maior estabilidade, era desejável valores maiores que 20mV em módulo (HAN et al., 2008).

Na tabela 11, estão relacionados os resultados obtidos com as formulações preparadas de acordo com o planejamento experimental.

Tabela 11: Resultados obtidos (tamanho, PDI e ZP) para as formulações dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo BZC (NLC_{BZC}), preparadas de acordo com o planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis				Respostas		
Código programa	A	B	C	Tamanho (nm)	PDI	ZP [-mV]
Formulação	Concentração Lipídica	Razão lipídio Sólido: Líquido	BZC (%m/m)			
1	15	60:40	1	142.1	0.133	-19.8
2	25	60:40	1	190.0	0.096	-24.3
3	15	80:20	1	184.0	0.131	-21.3
4	25	80:20	1	229.8	0.130	-28.4
5	15	60:40	3	209.7	0.122	-27.4
6	25	60:40	3	204.9	0.080	-30.6
7	15	80:20	3	254.5	0.182	-29.0
8	25	80:20	3	278.0	0.151	-31.8
9	20	70:30	2	203.0	0.126	-24.6
10	20	70:30	2	211.8	0.130	-23.1
11	20	70:30	2	207.4	0.121	-25.0

4.3.1 Interpretação das respostas obtidas no planejamento fatorial de NLC_{BZC}

A partir das respostas obtidas, o modelo matemático que descreve a influência dos componentes na resposta desejada foi gerado. O software utilizado (*Design Expert®*) demonstrou quais foram os parâmetros significativos através da análise da variância (One-Way ANOVA) com valor de $p < 0.05$. Dessa forma, foi possível verificar a interferência significativa de cada componente na resposta. A análise dos sinais dos coeficientes do modelo (ou efeitos) possibilitou avaliar a maneira como cada componente influencia a resposta: positivamente, caso o componente melhore a resposta esperada ou negativamente, se o mesmo interfere de maneira negativa na propriedade estudada. O programa permitiu, ainda, avaliar a interação entre os componentes, e como esta interação afeta a resposta. Em seguida, analisou-se cada propriedade de interesse e, no fim, otimizou-se a formulação.

4.3.1.1 Efeito dos fatores sobre o tamanho das partículas

Através da combinação dos níveis selecionados das variáveis independentes, o diâmetro médio das partículas obtidas foi de $142.1 \pm 4,5$ nm (formulação 1) a $278.0 \pm 3,7$ nm (formulação 8) como mostra a Tabela 11. Significativamente, os fatores que mais afetaram o tamanho de partículas ($p < 0.05$) foram: a concentração de BZC (C); a razão de lipídios sólidos:líquidos (SL:LL) (B), a concentração lipídica (A) e a interação entre os fatores AC (Tabela 12).

Tabela 12: Análise da variância para a resposta tamanho de partículas, no planejamento fatorial.

	p-valor	Significativo?	Tipo de efeito
Modelo Matemático	0,0002	Sim	-
A – Conc. Lipídica (TL)	0,0036	Sim	Positivo
B – razão SL:LL	0,0002	Sim	Positivo
C – Concentração de BZC	0,0002	Sim	Positivo
AC	0,0215	Sim	Negativo
Falta de Ajuste	0,1672	Não	-

Segundo SHI et al. (2016), os valores de p indicam a significância dos coeficientes; portanto, quanto menor for o valor de p , maior será a significância dos mesmos. De acordo com o coeficiente apontado, a concentração lipídica, a razão SL:LL e a concentração de BZC apresentaram efeito negativo no tamanho das partículas, e logo, promoveram aumento no diâmetro (Figura 13), enquanto a combinação entre os fatores AC teve efeito positivo (ou seja promoveu diminuição do diâmetro), embora pouco pronunciado ($p = 0,0215$).

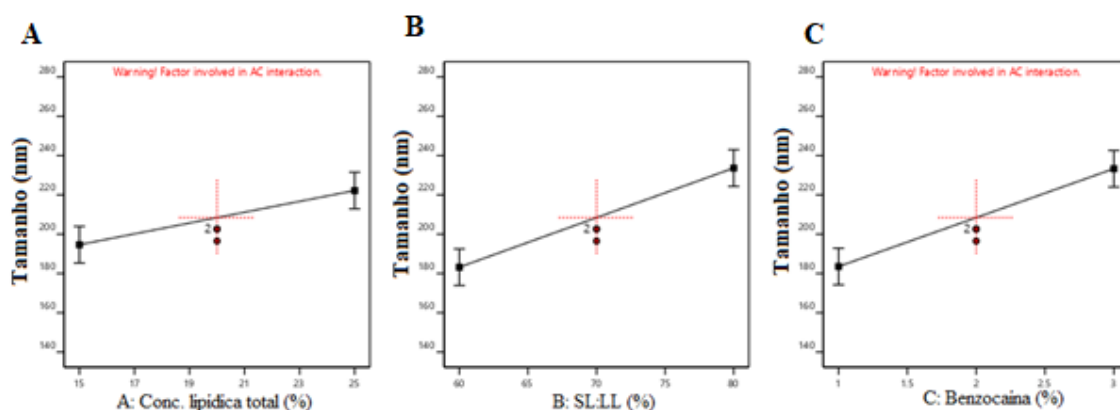


Figura 13: Efeito dos fatores sobre o tamanho das partículas: (A) Conc. Lipídica total; (B) razão SL:LL; (C) Benzocaína;

Os valores dos coeficientes de regressão (-50,45 para razão SL:LL, -49,75 para BZC e -27,55 para concentração lipídica) ressaltam a medida com que as variáveis independentes afetam as respostas. Quantitativamente, o valor negativo antes de um fator na equação de regressão indica que a variável diminui com a mudança no nível do fator, e vice-versa (POURFARZAD et al. 2014; PRADHAN et al., 2015).

Quanto maior foi a razão SL:LL, maior foi o tamanho das partículas, ou seja, a razão de lipídios SL:LL apresentou um efeito negativo no tamanho de partícula. Portanto, a maior quantidade de lipídio sólido (CP) presente no sistema, possivelmente, refletiu no aumento da viscosidade da fase lipídica, causando, dessa forma, a redução da eficácia dos processos de quebra de partículas (homogeneização e sonicação), o que pode resultar em partículas de tamanho maior (RAHMAN et al. 2010; ZHANG et al., 2010; FANGUEIRO et al., 2012; LASOÑ et al., 2013; PRADHAN et al., 2015).

A concentração total de lipídios na matriz também afeta muito o tamanho das partículas e a eficiência de encapsulação dos NLC. Quando a concentração lipídica total é aumentada, maiores tamanhos de partículas de NLC são obtidos, o que pode ser relacionado ao aumento da eficiência de encapsulação dos fármacos e, portanto, justificar a incorporação da BZC na matriz lipídica (SHAH et al., 2017; MENDES et al., 2019).

Como descrito anteriormente, a interação entre os fatores AC apresentou valor positivo em seu coeficiente, i.e, tal combinação proporcionou partículas de diâmetro menor (Figura 14).

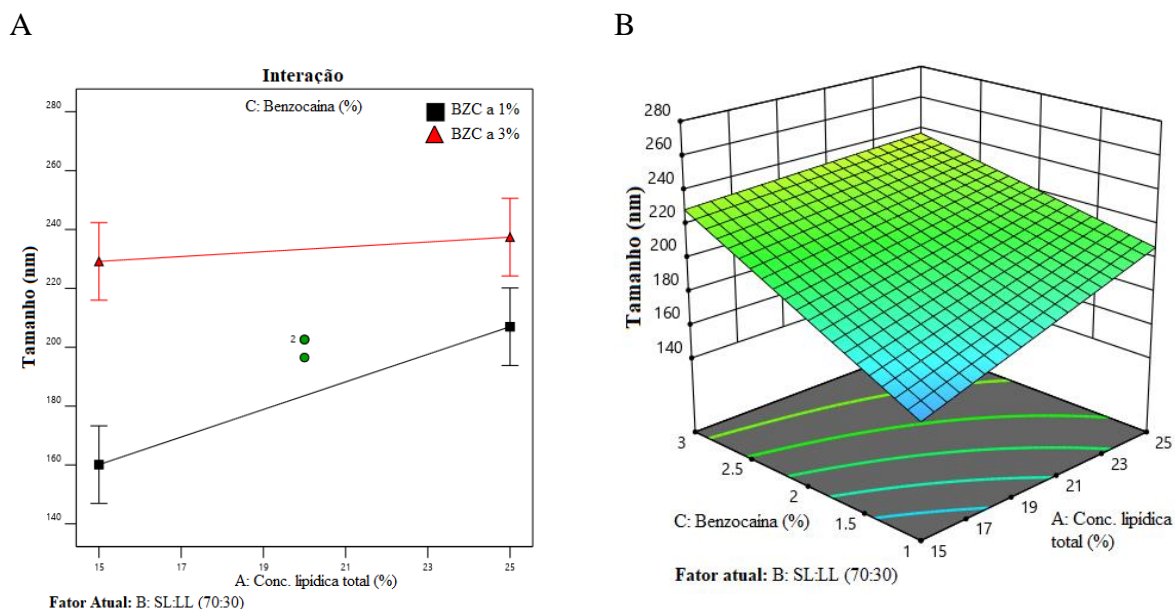


Figura 14: Interação entre os fatores Conc. Lipídica total e BZC, demonstrando o aumento no diâmetro das partículas.

4.3.1.2 Efeito dos fatores sobre o índice de polidispersão

Os valores referentes ao índice de polidispersão (PDI) apresentaram variação entre $0,080 \pm 0,03$ (Formulação 6) e $0,182 \pm 0,03$ (Formulação 7), de acordo com a Tabela 11. Os seguintes fatores independentes parecem influenciar significativamente o PDI ($p < 0,05$): a razão SL:LL (B), a concentração lipídica total (A) e a combinação entre os fatores BC, conforme tabela 13.

Tabela 13: Análise da variância para a resposta PDI no planejamento fatorial.

	p-valor	Significativo?	Tipo de efeito
Modelo Matemático	0,0043	Sim	-
A - Conc. Lipídica (TL)	0,0144	Sim	Negativo
B -razão SL:LL	0,0021	Sim	Positivo
C -concentração de BZC	0,1050	Não	-
BC	0,0241	Sim	Positivo
Falta de Ajuste	0,6102	Não	-

Conforme análise obtida, o fármaco isoladamente não exerceu efeito significativo sobre o PDI, com valor $p > 0,05$. A variável concentração lipídica total (TL) teve efeito positivo sobre o PDI, enquanto a razão SL:LL e a interação entre a razão SL:LL e fármaco (BC) apresentaram efeito negativo, ou seja, os maiores níveis desses fatores elevaram o valor de PDI (Figura 15).

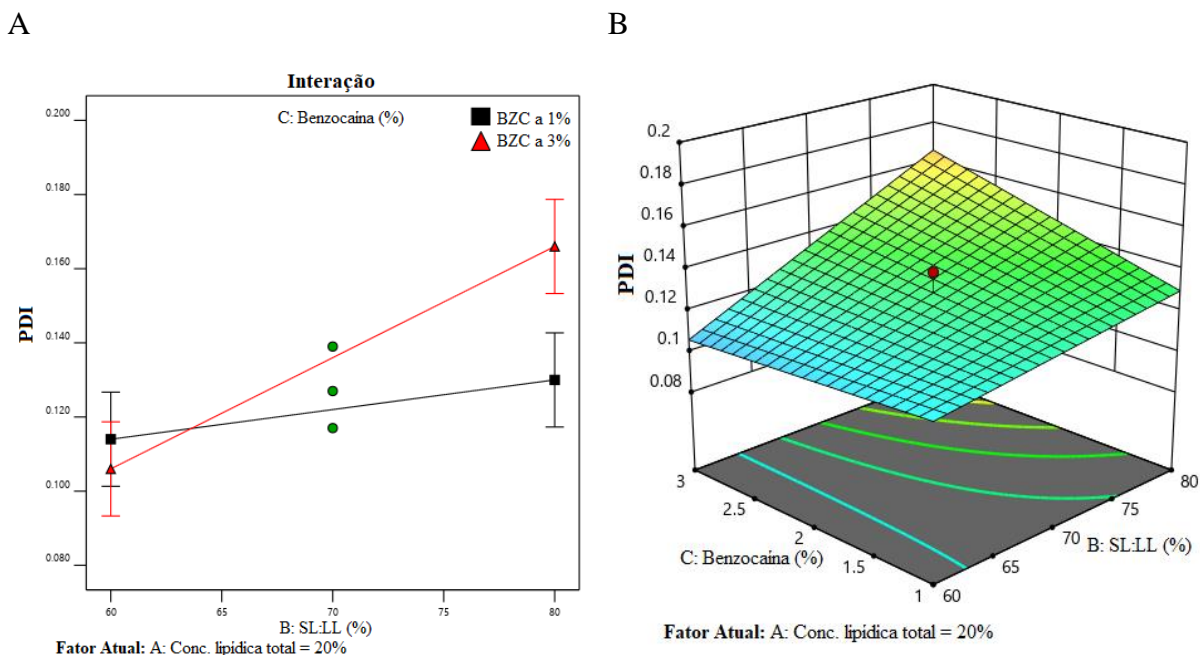


Figura 15: **A:** Gráfico da interação entre BZC e relação entre lipídios (SL:LL). Reta em preto: BZC a 1% (menor nível); reta em vermelho: BZC a 3% (maior nível); **B:** Superfície de resposta 3D para PDI. **Fator atual:** Concentração lipídica total: 20%.

4.3.1.3 Efeito dos fatores sobre o potencial zeta

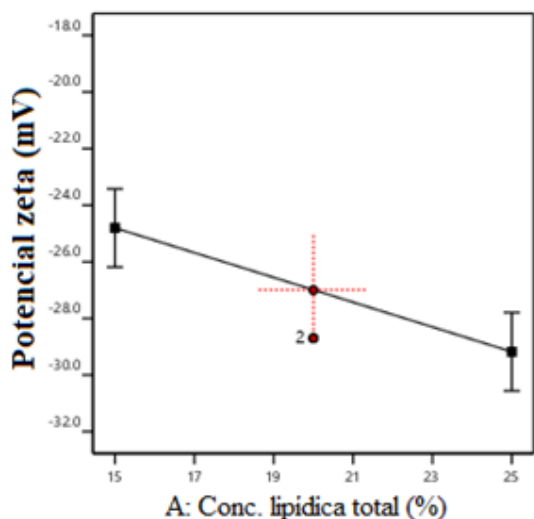
O potencial zeta (ZP) é um parâmetro inferido a partir da mobilidade eletroforética das partículas. O mesmo está relacionado as cargas superficiais na camada de Stern que se encontra na interface entre a superfície da nanopartícula e o meio. Este parâmetro aponta para o grau de repulsão entre partículas e, portanto, esta força impede a agregação entre as mesmas (ZHANG et al., 2010; CHEN et al., 2015). A variação experimental para o ZP foi de $-19,8 \pm 1,7$ mV (formulação 1) a $-31,8 \pm 0,7$ mV (formulação 8), de acordo com a Tabela 11. Os coeficientes do modelo demonstraram que as variáveis independentes concentração de BZC (C) e concentração lipídica total (A) influenciaram significativamente nos valores de ZP ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14: Análise da variância para a resposta potencial zeta, no planejamento fatorial.

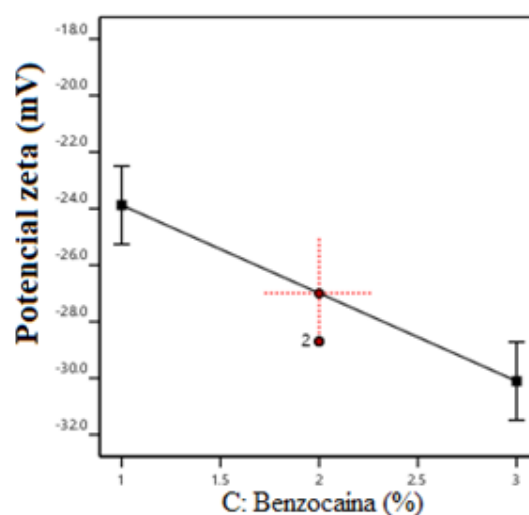
	p-valor	Significativo?	Tipo de efeito
Modelo Matemático	0,0008	Sim	-
A -Conc. Lipídica (TL)	0,0065	Sim	Positivo
C -concentração de BZC	0,0008	Sim	Positivo
Falta de Ajuste	0,2306	Não	-

Segundo PUGLIA et al. (2014), o ZP é um parâmetro importante, pois permite a observação da estabilidade das partículas dispersas. Segundo os autores, valores elevados de ZP (positivos ou negativos) permitem avaliar a estabilização do sistema nanoparticulados, sendo que fenômenos de instabilidade, como, por exemplo, agregação são improváveis de acontecer em sistemas com partículas de ZP (> -30 mV), em consequência da repulsão eletrostática entre partículas com mesma carga elétrica. A presença de BZC, assim como a concentração lipídica total exerceram efeito positivo, tal que maiores concentrações das mesmas elevaram o ZP (número de cargas negativas, em módulo) (Figura 16), favorecendo a repulsão entre as NLC e, conseqüentemente sua estabilidade durante armazenamento.

A



B

**Figura 16:** Gráfico dos efeitos sobre o potencial zeta: (A) Conc. Lipídica total; (B) Benzocaína;

4.3.1.4 Otimização das formulações

Após a análise dos dados pelo software *Design Expert*®, foi gerado o modelo matemático para cada propriedade de interesse. Dessa forma, foi definida a otimização de uma formulação que atendeu aos parâmetros de interesse. Com base no modelo matemático construído, gerou-se um gráfico mostrando o ponto que a formulação atende aos critérios de interesse: menores tamanho de partículas e PDI e maior ZP, em módulo. O parâmetro de desejabilidade aponta diretamente a formulação que melhor atende aos critérios desejados (valores mais próximos de 1), conforme apresentado na Figura 17.

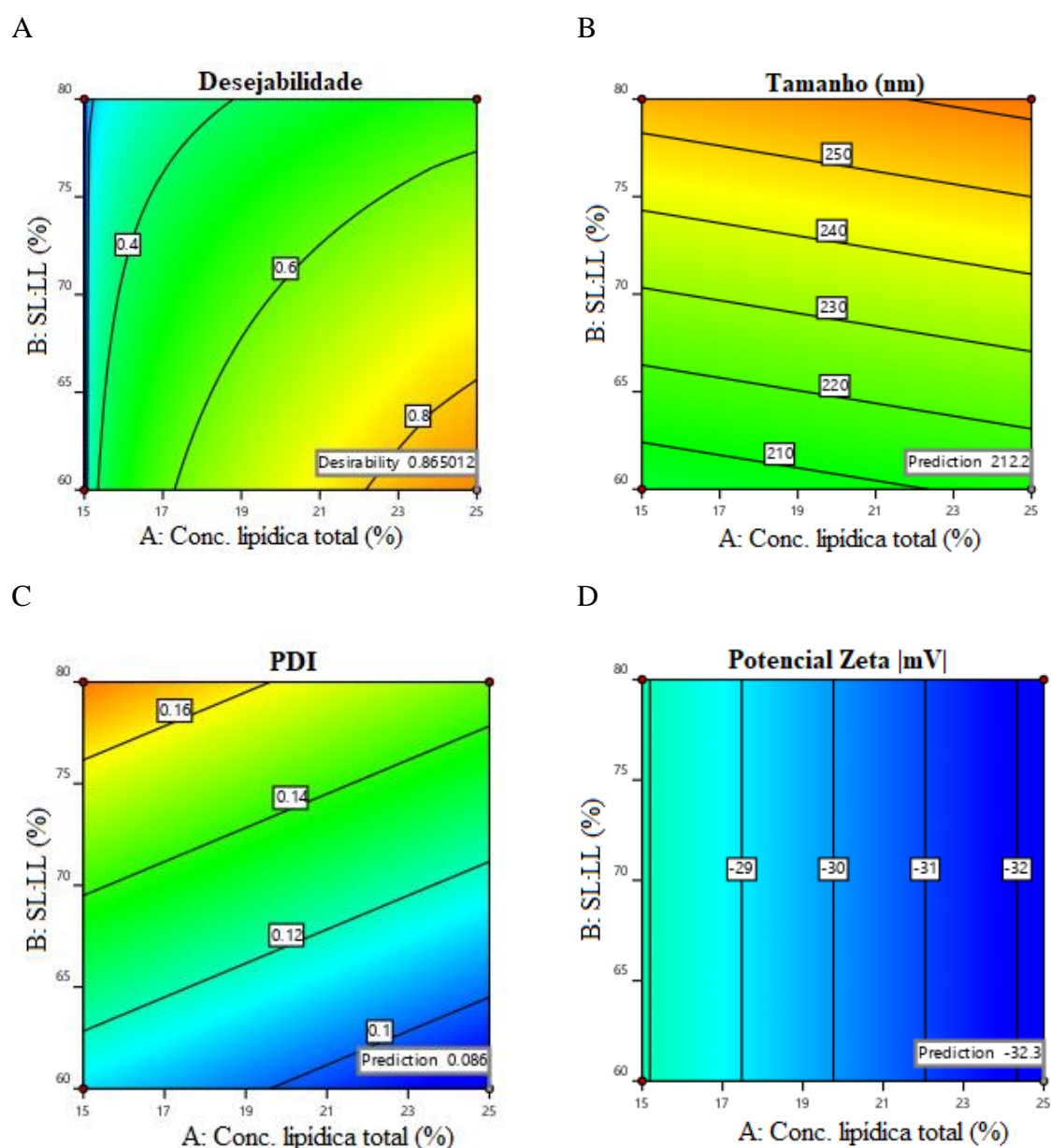


Figura 17: A: Gráfico de desejabilidade obtido a partir das propriedades de interesse desejadas; B: Resposta prevista para tamanho de partículas; C: Resposta prevista para PDI; D: Resposta prevista para ZP; Concentração de BZC no nível alto (3%);

Para valores de desejabilidade maiores, seleciona-se a concentração do fármaco e concentração lipídica total em seu nível mais alto, ou seja 3% e 25%, respectivamente. Em relação à razão SL:LL, a proporção 60:40% apresentou melhores resultados. Dessa forma, atingimos uma desejabilidade de 0,865 na formulação otimizada com as concentrações selecionadas (Figura 17A).

O software é capaz de prever ainda as propriedades de interesse para uma amostra hipotética (Figura 17B, 17C e 17D). Uma amostra experimental foi preparada no ponto previsto, contendo Conc. Lipídica total de 25%, razão SL:LL em 60:40% e concentração de BZC em 3%. O resultado apresentou ótima correlação, como demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15. Comparação entre os resultados previstos pelo programa e os encontrados experimentalmente.

	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta [mV]
Previsto	212.2	0,086	-32,3
Experimental	188.1 \pm 3.6	0.090 \pm 0.024	-35.2 \pm 0.8

Neste ponto, entendemos como cada componente influenciou na formulação de escolha, alterando as propriedades de interesse. Dessa forma, através das interações entre as variáveis, selecionou-se a Formulação 6, pertencente ao planejamento fatorial, como solução aos critérios pretendidos, confirmando ser possível a utilização do modelo proposto.

A partir deste ponto, o estudo teve continuidade com a referida amostra otimizada, nas seguintes concentrações: concentração lipídica total, 25%; razão SL:LL, 60:40%; concentração de BZC, 3%, com o surfactante Pluronic®F68 na concentração de 5%.

Uma formulação sem BZC (NLC) foi preparada para ser utilizada nos estudos estruturais em caráter comparativo (controle) (Tabela 16).

Tabela 16. Propriedades da formulação otimizada, e seu controle (sem BZC). Estas formulações foram utilizadas para caracterização e demais testes. NLC = carreador lipídico nanoestruturado sem BZC, NLC_{BZC} = carreador lipídico nanoestruturado com BZC a 3%.

	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta [mV]	Nº partículas/mL (10¹⁴)
NLC	180,2 \pm 1,7	0,085 \pm 0,022	-28,2 \pm 0,5	1,67 \pm 0,07
NLC_{BZC}	188,1 \pm 3,6	0,090 \pm 0,024	-35,2 \pm 0,8	1,90 \pm 0,06

4.3.2 Análise por rastreamento de nanopartículas

Segundo FILIPE et al. (2010), a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) é uma técnica inovadora para o dimensionamento de partículas. O método permite a medida simultânea das nanopartículas em suspensões líquidas (análise multiparamétrica), sendo possível fornecer informações sobre a distribuição de tamanho, concentração de partículas e, ainda, permitir a visualização direta das mesmas em tempo real (GROSS et al., 2016).

O diâmetro médio das partículas é estabelecido através do rastreamento individual das nanopartículas em movimento Browniano, relacionando-o ao tamanho de partícula, utilizando a fórmula derivada a partir de Stokes-Einstein (GROSS et al., 2016). As medidas de DLS e NTA são complementares, e a análise conjunta dos resultados de ambas as técnicas possibilita a correção de erros relacionados às medidas de diâmetro, causadas pela não homogeneidade do sistema nanodisperso.

Os diâmetros médios obtidos por DLS para uma mesma amostra foram maiores que os determinados por NTA. De acordo com a literatura, valores inferiores do diâmetro médio de partículas no NTA em relação ao DLS podem ocorrer, pois cada partícula é rastreada separadamente. Segundo FILIPE et al. 2010, a estimativa resultante da distribuição de tamanho de partícula não é afetada pela limitação de ser uma intensidade ponderada. É preciso levar em conta também as diferenças das concentrações das amostras (a diluição das amostras em NTA são maiores que as em DLS). As medidas de NTA resolvem melhor as diferenças de tamanho na quantificação das partículas em comparação com DLS, principalmente quando a amostra é polidispersa, além de permitir quantificar o número de partículas em suspensão (GROSS et al., 2016).

O diâmetro médio das nanopartículas através do NTA encontra-se descrito na tabela 17. Nota-se que o NLC apresenta diâmetro médio ligeiramente inferior a formulação contendo o fármaco (NLC_{BZC}). Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Os valores obtidos de D10%, D50% e D90% (D10% $98,7 \pm 1,2$ a $108,0 \pm 0,5$ nm; D50% $126,0 \pm 1,0$ a $142,9 \pm 2,8$ e D90% $179,8 \pm 8,0$ nm a $219,0 \pm 9,7$ nm) encontram-se dentro da faixa de diâmetro de tamanho médio das medidas de DLS.

Tabela 17. Tamanho médio e dados cumulativos do diâmetro das partículas, determinados por NTA. Valores expressos em média \pm d.p., com $n = 3$. D10, D50, D90 refere-se ao diâmetro com base em 10%, 50% e 90% do perfil de distribuição cumulativa.

Amostras	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)	Diamêtro médio (nm)	Span	Concentração (10^{14} partículas/mL)
NLC	98,7 \pm 1,2	126,0 \pm 1,0	179,8 \pm 8,0	134,1 \pm 2,9	0,64	1,67 \pm 0,02
NLC _{BZC}	108,0 \pm 0,5	142,9 \pm 2,8	219,0 \pm 9,7	155,0 \pm 2,0	0,78	1,90 \pm 0,07

Através da determinação do valor de Span, que apresentou variação entre 0,64 - 0,78, avaliamos a polidispersão das nanopartículas, comprovando a homogeneidade do sistema. Quanto menor for o valor de Span mais estreita será a distribuição de tamanho de partícula (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007). Segundo BIANCHIN et al. 2015, valores de Span inferiores a 2 caracterizam formulação com distribuição monodispersa, adequada para aplicações farmacêuticas.

O número de partículas/mL não apresentou variação expressiva na presença ou ausência da BZC nas formulações ($p < 0.05$), um indicativo da estabilidade coloidal e de que o fármaco não está sendo expulso do interior da nanopartícula.

4.3.3 Eficiência de encapsulação da BZC

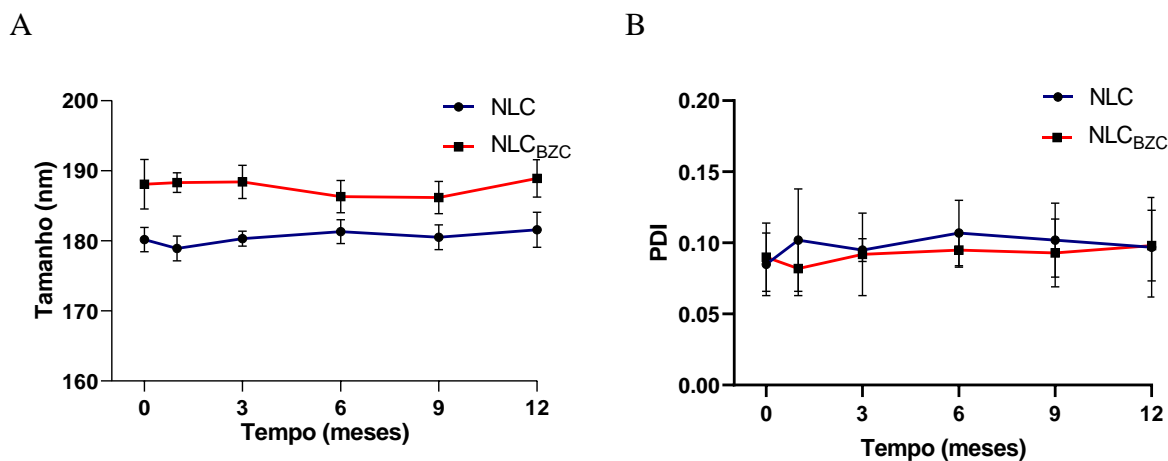
A eficiência de encapsulação do fármaco (%EE) pelo NLC otimizada foi determinada de forma indireta, através da quantificação da BZC não encapsulada (livre na fase aquosa, após filtração, como descrito no item 3.2.5.6) em relação ao teor do fármaco na suspensão (item 3.2.5.5), utilizando a Equação 2. A eficiência de encapsulação de BZC pelo NLC otimizado foi de $96,0 \pm 0,4$ com capacidade de armazenamento do fármaco (*drug loading*) de 11,52%. De fato, nos NLC, a matriz lipídica, proveniente da mistura de lipídios sólidos e líquidos, fornece imperfeições na malha cristalina, o que possibilita a criação de “espaço” suficiente para acomodar moléculas de fármaco, justificando, dessa forma, a melhor capacidade de carreamento e maior eficiência de retenção do fármaco em relação as SLN (HU et al., 2005; TIWARI & PATHAK, 2011).

Os resultados apresentados mostram a eficiência do processo de otimização das formulações e revelam a elevada lipofilicidade da BZC, o que favorece sua interação com os lipídios responsáveis pela formação da matriz lipídica dos NLC. A partir dos resultados obtidos,

podemos ainda deduzir que as imperfeições criadas na matriz lipídica com a adição do lipídio líquido permitiu acomodar as moléculas do fármaco, levando, portanto, ao aumento da eficiência de encapsulação e capacidade de armazenamento do fármaco (MÜLLER et al., 2002).

4.3.4 Estudo da estabilidade das formulações

O estudo da estabilidade é um fator primordial para as formulações farmacêuticas. O alto grau de cristalinidade do lipídio sólido, um dos problemas enfrentados nos carreadores lipídicos de primeira geração (SLN) que leva a expulsão do fármaco do seu interior com o tempo, justifica a análise da estabilidade dos NLC. A redução da expulsão nos NLC foi reduzida devido a adição do lipídio líquido, mas deve ser analisada (MÜLLER et al., 2002). Portanto, após a seleção da formulação otimizada por análise fatorial, o NLC_{BZC} foi armazenado em temperatura ambiente (25 – 30 °C) por 12 meses, durante os quais acompanhamos os parâmetros diâmetro médio, PDI, ZP, n° partículas/mL, %EE e pH (Figura 18).



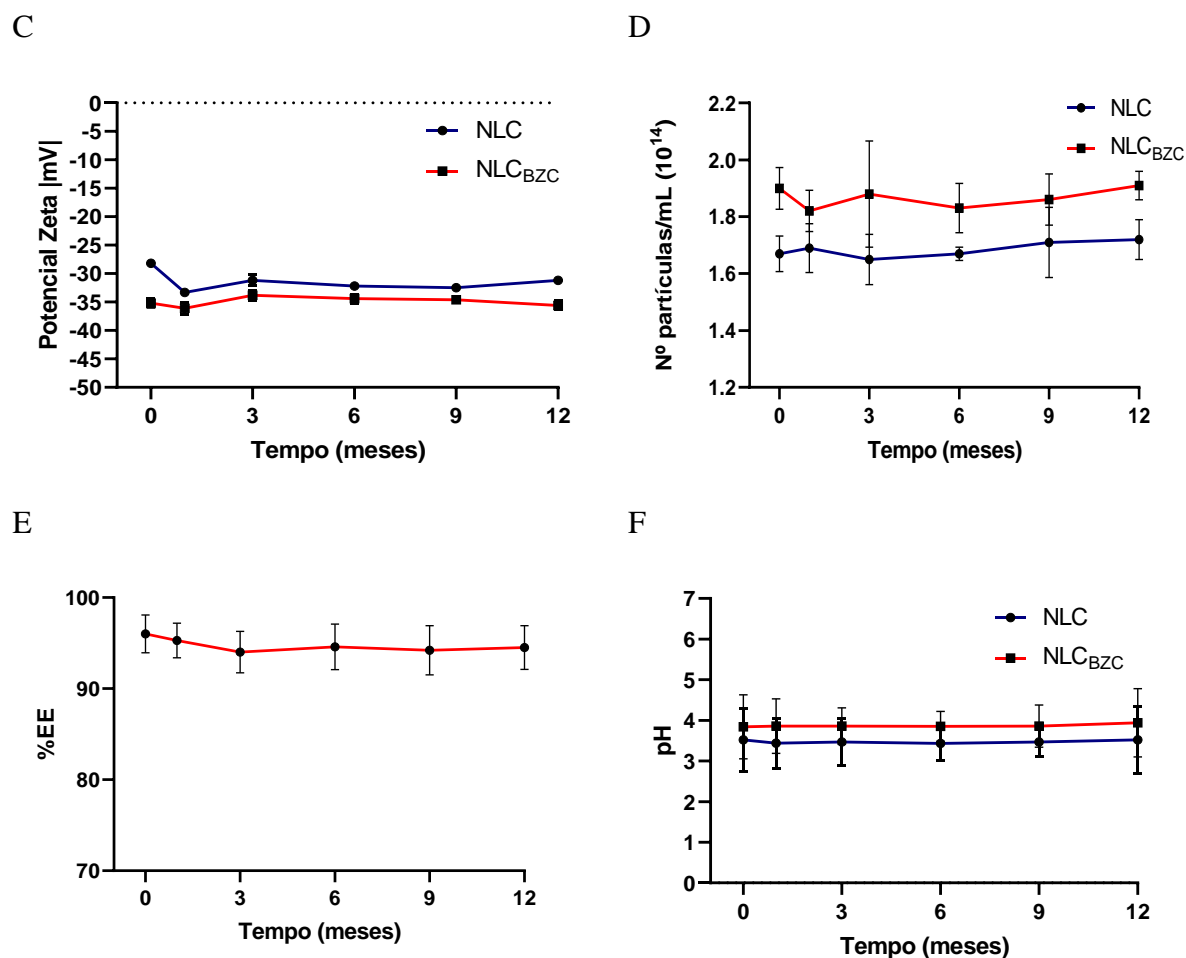


Figura 18. Medidas de estabilidade ao longo do tempo (360 dias), na temperatura ambiente. **A)** Variação do tamanho médio das partículas em função tempo; **B)** Variação do PDI; **C)** Variação do potencial Zeta; **D)** Variação do nº partículas/mL; **E)** %EE e **F)** Variação do pH. NLC_{BZC} = formulação otimizada, contendo BZC; NLC = controle, sem benzocaína. Análise estatística: One way ANOVA: $p < 0.05$.

De acordo com os resultados obtidos, nenhuma diferença estatística foi encontrada nas nanopartículas no período, em nenhum dos parâmetros analisados ($p < 0.05$). Concluímos, ainda, que a incorporação da BZC não desestabilizou este sistema coloidal, mantendo-o estável durante todo o período analisado. O anestésico não foi expulso do sistema tendo como base a não alteração nos valores de %EE e tamanho das nanopartículas.

Outra característica físico-química importante para avaliar a estabilidade da NLC refere-se às alterações na cristalinidade da matriz lipídica, que será discutida no item 4.3.6.

4.3.5 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para auxiliar na caracterização da morfologia do NLC selecionado, as imagens de microscopia eletrônicas foram realizadas. As Figuras 19A e B mostram o NLC controle e as Figuras 19C e D representam amostras de NLC_{BZC}. As micrografias mostraram partículas com superfícies bem delineadas e morfologia aproximadamente esférica. A variação de tamanho das partículas foi de 100 a 250 nm, com e sem fármaco. Os resultados foram condizentes com os dados obtidos por DLS e NTA. Com relação à integridade das nanopartículas, ficou evidente que a encapsulação da BZC não apresentou perturbação do sistema.

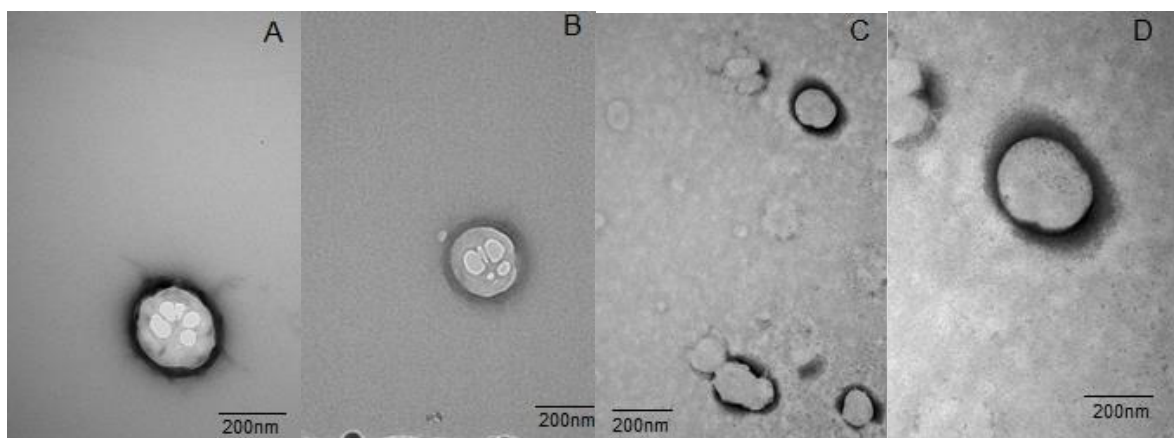


Figura 19. MET: Micrografias das nanopartículas lipídicas otimizadas, sem (A e B) e com (C e D) benzocaína, em duas magnitudes: 60.000x (A e C) e 100.000x (B e D). Escala = 200 nm.

4.3.6 Análises de Criomicroscopia eletrônica

A Criomicroscopia eletrônica (Cryo-TEM) é uma técnica de microscopia eletrônica de transmissão usada principalmente para análises morfológicas de ultraestruturas. Nela, as formulações são submetidas a temperaturas criogênicas, para preservar sua estrutura e possibilitar à análise tridimensional das biomoléculas (TORRE et al., 2007). A análise morfológica desempenha papel fundamental na elucidação das ultraestruturas dos NLC (KUNTSCHE et al., 2011). O Cryo-TEM permite uma investigação da estrutura interna das formulações nanométricas com e sem o fármaco (ESPOSITO et al., 2008; CORTESI et al., 2017).

As imagens da criomicroscopia eletrônica foram realizadas para auxiliar na caracterização da ultraestrutura da NLC otimizada. As Figuras 20A e C mostram a NLC

controle (sem benzocaína) e as Figuras 20B e D apresentam a NLC_{BZC}. As imagens revelaram estruturas com morfologia aproximadamente esférica bem delineadas, estando de acordo com estudos anteriores (KUNTSCHE et al., 2011). Observamos que os painéis mostram partículas com morfologia circulares semelhantes com e sem a presença do fármaco. Esses resultados, estão de acordo com os achados do DLS, NTA e MEV. Com está técnica, há mais um indicativo de que a capacidade de armazenamento do sistema é alta, uma vez que a concentração de lipídio seria suficiente para carregar grandes quantidades de fármaco.

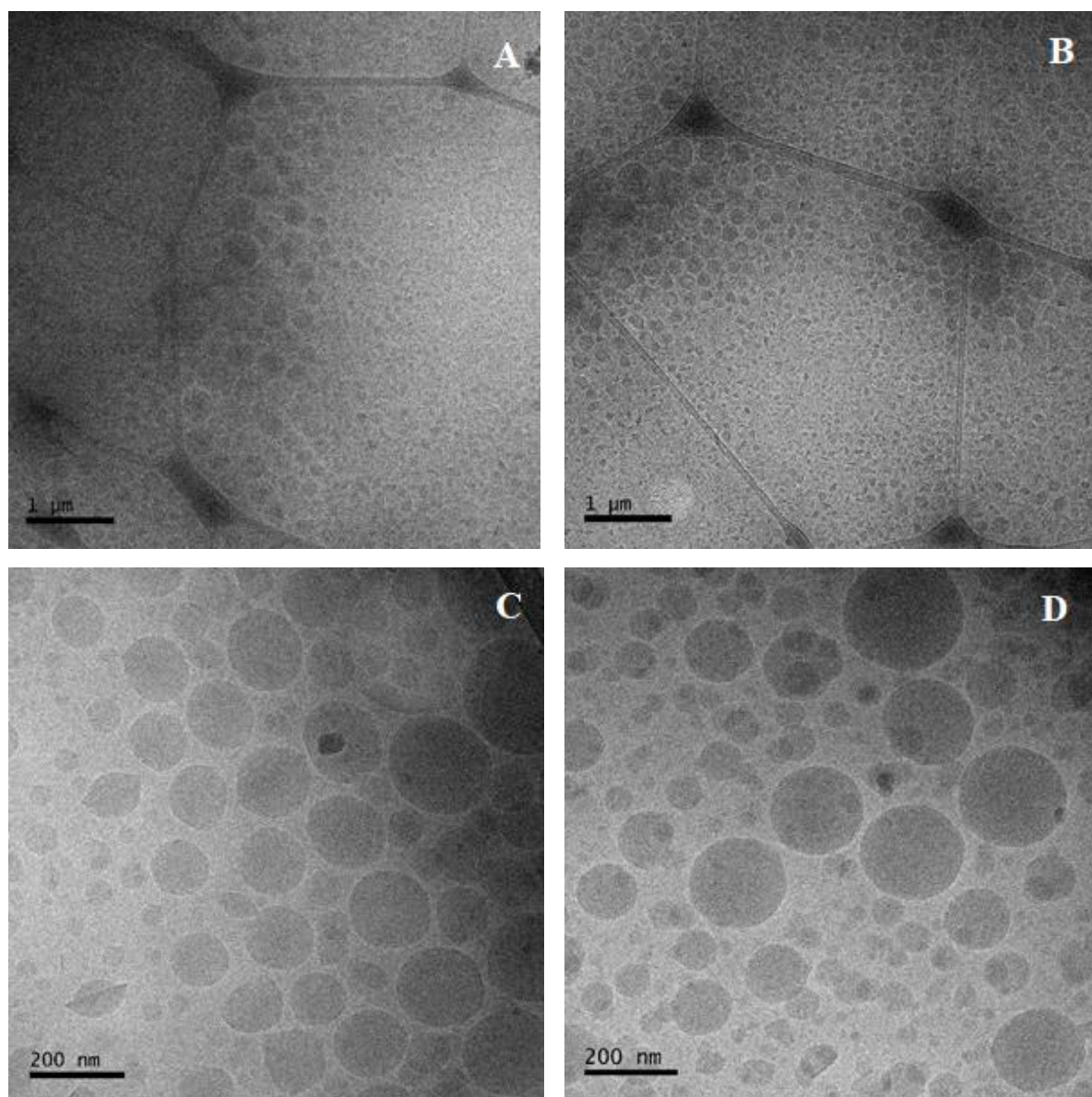


Figura 20: Cryo-TEM. Micrografias (MET) dos NLC (A e C) sem fármaco e com BZC (B e D); nas seguintes escalas: 1 µm (A e B) e 200 nm (C e D).

4.3.7 Análise por Calorimetria Diferencial de Varredura

O estudo da cristalinidade lipídica nos NLC é uma parte primordial na sua caracterização. Segundo MÄDER & MEHNERT, 2001, a relação entre as modificações lipídicas e a incorporação de fármacos já é bem descrita na literatura e é um ponto que diferencia as nanopartículas com um “core” formado fundamentalmente por lipídio sólido (SLN), das nanopartículas compostas por lipídio sólido e líquido (NLC).

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi utilizada para avaliar alterações na transição de fases dos lipídios. A utilização da técnica se justifica, já que modificações na composição lipídica podem ser observadas pela modificação dos pontos de fusão e entalpia dos constituintes lipídicos. Em geral, a mudança de fases requer menos energia, quando numa mistura lipídica. Dessa forma, quanto mais desorganizada estiver a matriz lipídica, menor será o ponto de fusão e a cristalinidade do lipídio sólido (menor entalpia).

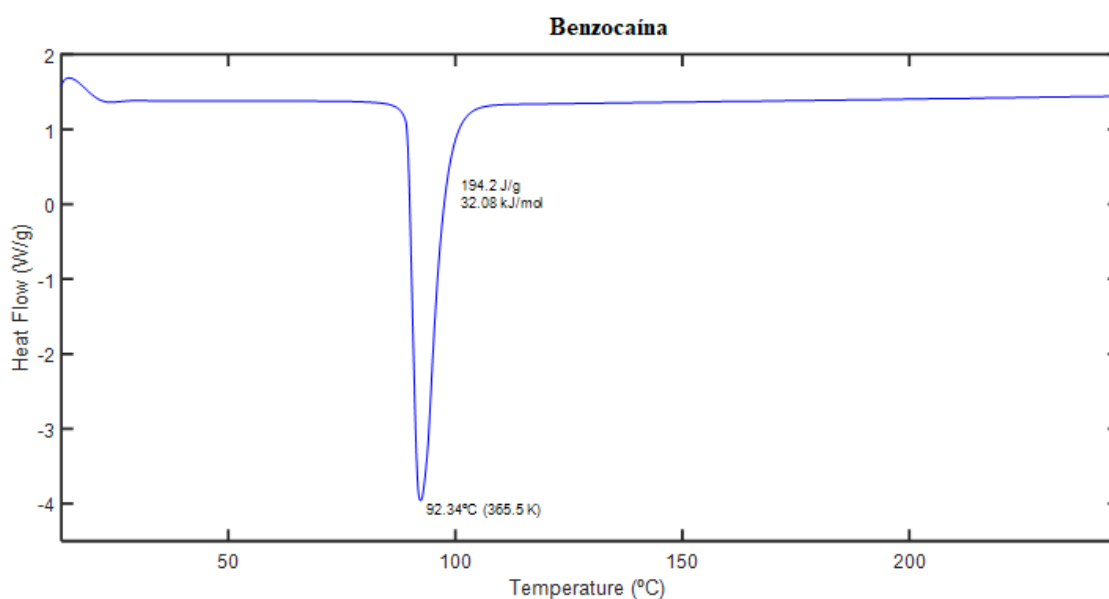


Figura 21: Termograma da BZC.

A Figura 21, mostra o termograma obtido para a BZC, mostrando seu ponto de fusão em 92,3°C, de acordo com a literatura, que indicam transição na faixa entre 88 e 92°C (FULIAS et al., 2013).

Os termogramas da Figura 22 mostram o ponto de fusão do palmitato de cetila em 56,4°C, de acordo com a literatura (RODRIGUES DA SILVA et al., 2020) e do surfactante Pluronic®P68 (54,7°C), também dentro da faixa esperada (entre 50-55°C de acordo com

RODRIGUES DA SILVA et al., 2020). CP e P68 são os principais componentes dos NLC. No NLC controle, uma única transição foi observada, em 53°C, em concordância com a literatura (RODRIGUES SILVA et al., 2020). Como o NLC é uma mistura entre lipídio sólido (CP) e lipídio líquido (Capmul®PG-8 NF), é esperado que haja alteração no DSC da nanopartícula, com o deslocamento de temperatura e alargamento dos picos do lipídio sólido, em relação aos compostos puros.

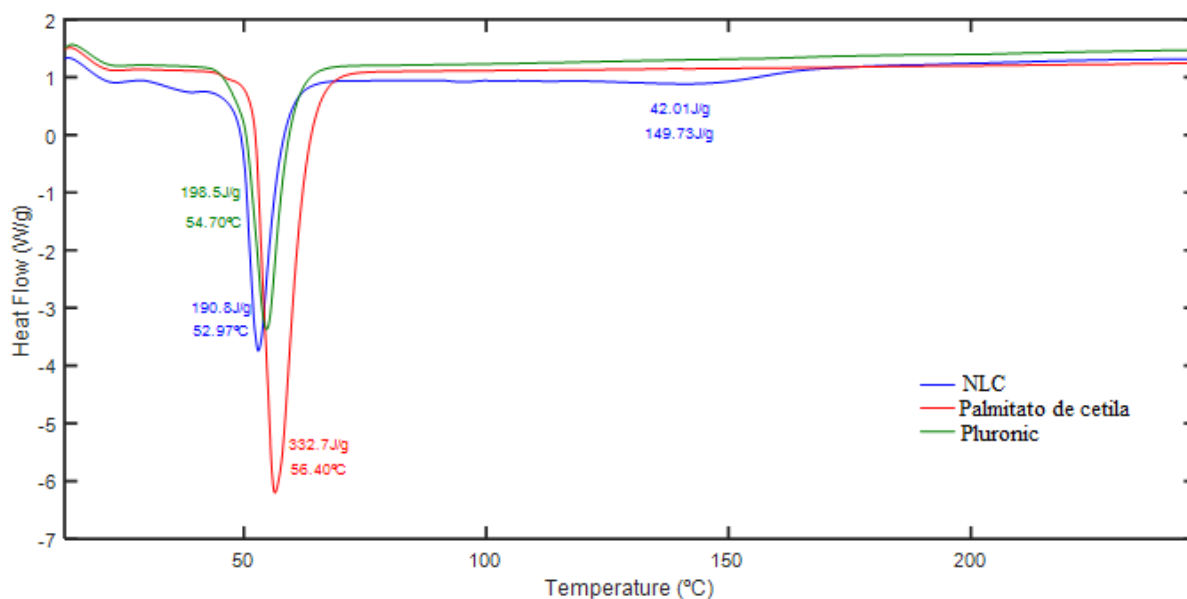


Figura 22: Termograma NLC, palmitato de cetila e Pluronic F68.

A adição do lipídio líquido nos NLC altera a estrutura lipídica, provocando diminuição do ponto de fusão, entalpia e índice de cristalinidade (IC) do CP (Tabela 18). A diminuição da cristalinidade lipídica nos NLC é bastante relatada na literatura (ALI et al., 2010).

Tabela 18: Entalpia de fusão e Índice de cristalinidade (IC) determinados por análise dos termogramas de DSC.

<i>Amostra</i>	Entalpia de fusão (J/g)	IC (%)
<i>Palmitato de cetila</i>	332,7	100%
<i>NLC</i>	190,8	57,35%
<i>NLC_{BZC}</i>	164,7	49,50%

A Figura 23 mostra o termograma obtido para o NLC_{BZC} e sua mistura física, formada por seus excipientes, mas não formulada.

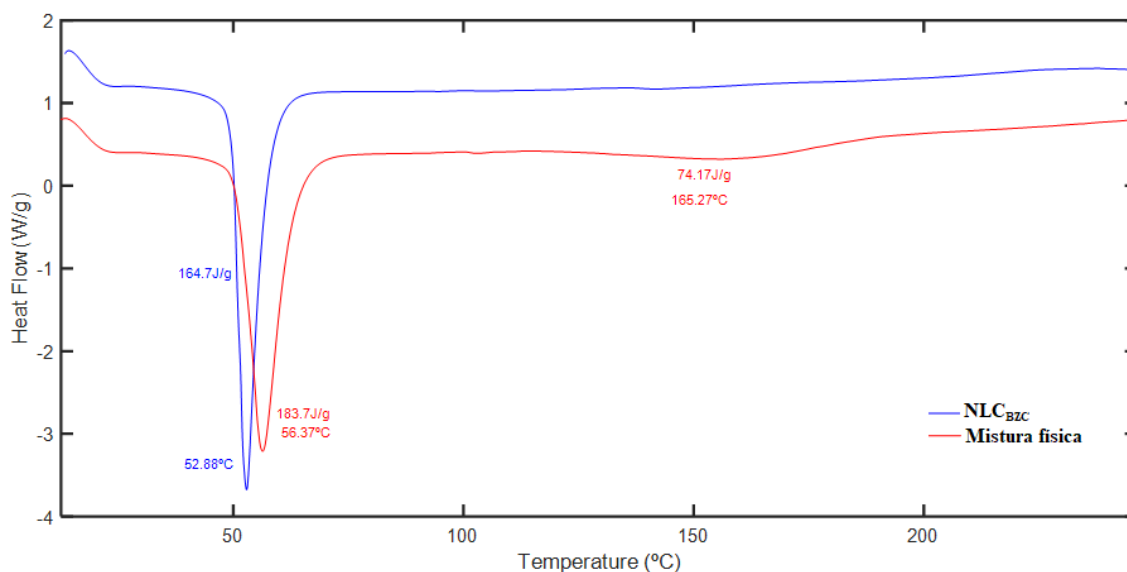


Figura 23: Termogramas da formulação otimizada (NLC_{BZC}) e da mistura física de seus excipientes.

Na mistura física o pico de transição é alargado, revelando a contribuição dos diferentes excipientes (CP e P68) e não foi possível observar o pico da benzocaína, indicando possível solubilização da mesma, no lipídio. Em relação ao NLC_{BZC} um único pico foi observado em 53°C, semelhante ao observado com o NLC controle. O deslocamento do pico em relação a mistura física indica interação entre os excipientes, compatível com a formação do NLC, como evidenciado também pelas medidas de difração de Raio-X (item 4.3.8).

A Figura 24 evidencia a interação da BZC e seus efeitos no NLC.

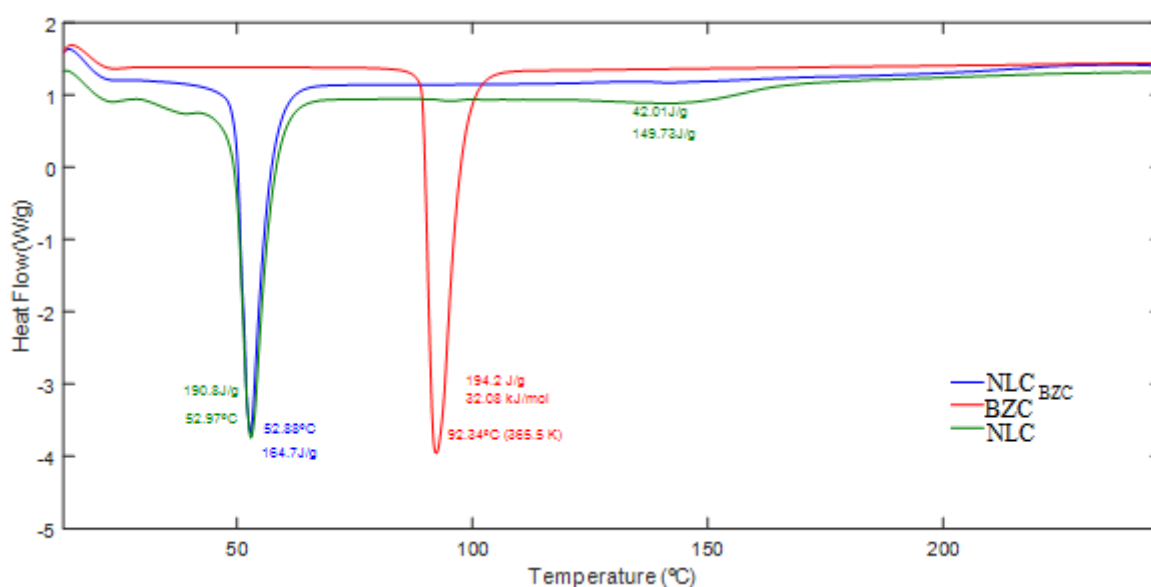


Figura 24: Termogramas das amostras de BZC, NLC e NLC_{BZC}.

Na amostra de NLC_{BZC}, a indicação de que o anestésico foi incorporado a matriz lipídica, é demonstrado pela não observação de pico referente à BZC livre. A diminuição da temperatura da entalpia de transição (92,34 °C para 52,88 °C e 194,2 J/g para 164,7 J/g) apontam para a dissolução da BZC na fase lipídica, o que provoca modificações da organização molecular e diminui a energia necessária para ocorrer a fusão (Figura 24). A Tabela 19 mostra as variações na temperatura, entalpia, entropia e energia livre de Gibbs, referentes à transição do lipídio sólido CP (puro), NLC controle e contendo BZC.

Tabela 19: Entalpia, temperatura, entropia e energia livre de Gibbs das amostras de palmitato de cetila (CP), NLC e NLC_{BZC}.

Amostra	Entalpia (J/g) (ΔH)	Temperatura (K)	Entropia (ΔS)	Energia livre de Gibbs (ΔG)
CP	332,7	329,55	0,2066	264,61
NLC	190,8	326,12	0,1940	127,53
NLC _{BZC}	164,7	326,03	0,1937	101,55

4.3.8 Análise por difração de raio-X

De acordo com BUNJES (2011), a difratometria de Raios-X é um método que analisa alterações no arranjo cristalino das nanopartículas lipídicas. Através desta análise no caso dos NLC, duas informações podem ser obtidas: mudanças na estrutura cristalina do fármaco, mostrando a ausência dos picos de difração de sua forma cristalina, o que pode indicar sua presença junto a matriz lipídica, e formação de estrutura amorfa do lipídio sólido, devido a adição de lipídio líquido na formulação – caracterizada pela diminuição na intensidade e alargamento dos picos (GONZALEZ-MIRA et al., 2011; NEUPANE et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

Barbosa e col. 2018 empregaram a técnica para interpretação da organização estrutural das nanopartículas lipídicas. Seus resultados confirmaram que matrizes lipídicas compostas de palmitato de cetila e miristato de miristila – e uma mistura de triglicerídeos de ácidos capríco/caprílico – no caso dos NLC – podiam formar um arranjo lamelar no qual a dibucaína (base) foi encapsulada com sucesso, aumento o encapsulamento lipídico (BARBOSA et al., 2018a).

A difração observada no padrão da BZC revelou vários picos de intensidade acentuada (Figura 25), confirmando sua natureza cristalina, de forma polimórfica ortorrômica, de acordo com a literatura (CHAN et al., 2009; PACZKOWSKA et al., 2018).

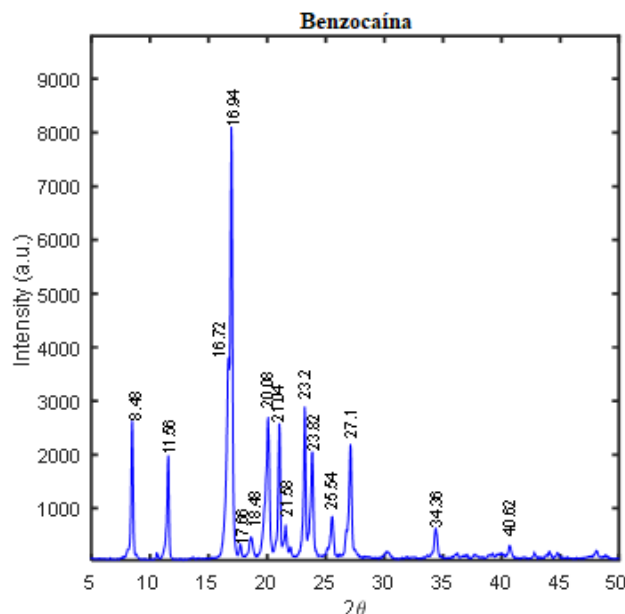


Figura 25: DRX - Difratograma da BZC.

Os lipídios sólidos caracterizam-se por apresentar polimorfismos por causa de sua organização estrutural, exibindo diferentes estruturas cristalinas. Essas alterações influenciam a encapsulação do fármaco e, portanto, alteram a estabilidade das nanopartículas lipídicas, demonstrando a importância da avaliação da cristalinidade (ÜNER, 2016). A Figura 26A exibe o difratograma do palmitato de cetila, com picos característicos em 21,54° e 23,92°, de acordo com o relatado na literatura. A alta intensidade demonstra o alto grau de cristalinidade do lipídio puro, (RUKTANONCHAI et al., 2008). Já o difratograma do P68 (Figura 26B) apresentou dois picos característicos de alta intensidade em 19,24° e 23,36°, também de acordo com a literatura (FATHY & EL-BADRY, 2003).

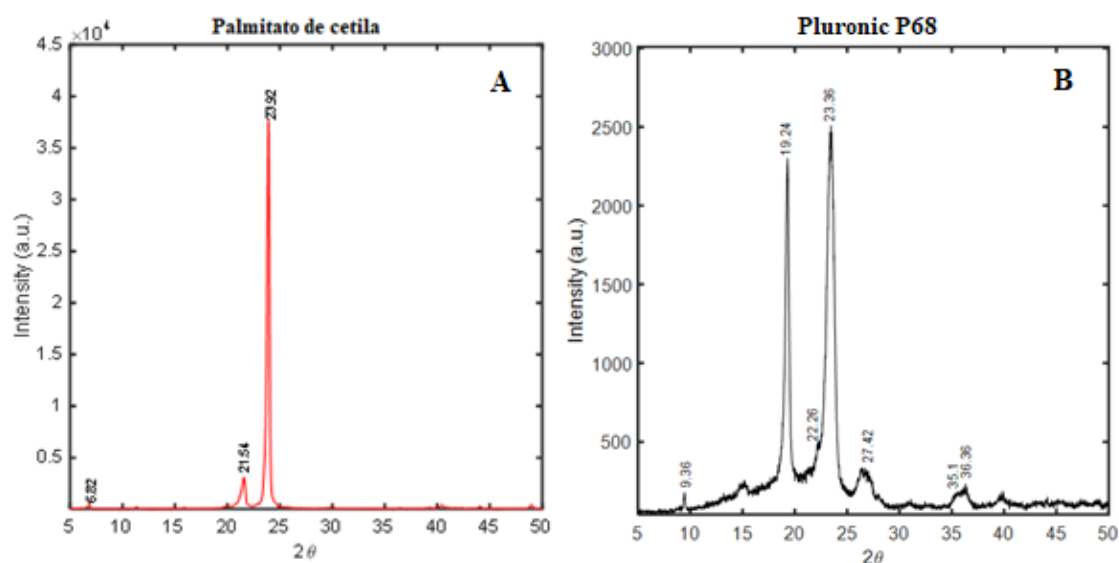


Figura 26: DRX – Difratomogramas dos excipientes: (A) palmitato de cetila; (B) Pluronic® P68.

Na Figura 27 o difratograma do NLC_{BZC} otimizado é comparado com aquela da BZC pura, e da mistura física. A intensidade dos picos agudos observados no difratograma da BZC pura se reduziu nas amostras do NLC_{BZC}, indicando perda de cristalinidade do anestésico, quando inserido nas nanopartículas. Igualmente houve perda de intensidade nos picos de difração da mistura física, que apresenta todos os excipientes utilizados na formulação inclusive o fármaco, sem a presença de picos característicos do fármaco nos NLC, o que pode indicar inserção do anestésico na matriz lipídica dos NLC (CARVALHO & PINTO, 2012; TORRES, 2018).

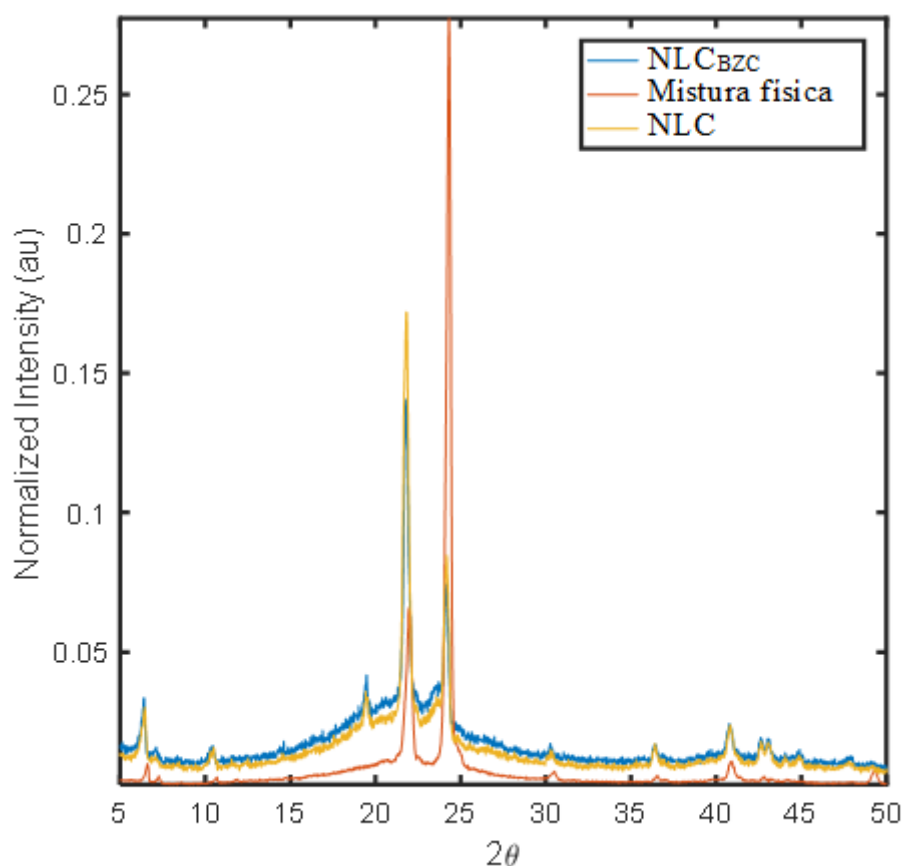


Figura 27: DRX – Difratoograma de NLC_{BZC} , NLC e Mistura física.

4.3.9 Análise por difração de nêutrons

A Difração de Nêutrons (SANS) é uma técnica versátil para estudar a estrutura de objetos em escala nanométrica. O método é bastante útil para caracterização estrutural de macromoléculas e sistemas macromoleculares como polímeros, copolímeros partículas ou micelas na faixa de algumas centenas de nanômetros. Os nêutrons são ondas de espalhamento valiosas, pois oferecem liberdade em relação ao contraste da densidade do comprimento do espalhamento e classificação isotópica das amostras (VOGTT et al., 2014).

Em estudos com SLN, a técnica demonstrou ser sensível para as características da superfície em uma ampla faixa q , de $0,005$ - $0,5\text{\AA}^{-1}$, sendo importante para completa caracterização da estrutura da SLN (VOGTT et al., 2014; YOKAICHIYA et al., 2017). Chen et al. (2014), utilizaram SANS para estudar a microestrutura da NLC com fármacos pouco solúveis e suas propriedades de liberação, observando que a formulação de NLC contendo docetaxel apresentava superfície perfeitamente lisa, com expoente de Porod = -4, enquanto a

NLC sem o fármaco apresentava superfície áspera, expoente Porod = -3,33 (CHEN et al., 2014; SHAH et al., 2019). Aqui, a técnica de SANS foi usada para avaliar eventuais mudanças estruturais nas NLC, causadas pela adição da BZC.

Os resultados para a amostra de NLC controle (sem fármaco) em função da temperatura estão mostrados na Figura 28. O difratograma não demonstra organização lamelar, nem tampouco apresenta pico na posição de 0.1396 \AA^{-1} - relacionado ao parâmetro de rede de 45.0 \AA - que indicaria a existência de outro tipo de ordenamento da matriz lipídica. A largura a meia altura desse pico variou de 0,11 (25°C) para 0,03 (40°C), indicando que a mosaicidade deste ordenamento diminui com aumento da temperatura.

Além disso, as curvas de SANS sugerem a formação de um cluster (curva verde do gráfico 28B e 28C) do tipo hidrofóbico (interações entre as partes hidrofóbicas das cadeias lipídicas dentro da NLC), nas temperaturas de 37°C e 40°C , cujos valores de comprimento de correlação são de 30 e 25 \AA , respectivamente. Observa-se, ainda, superfície lisa na NLC, o que supõe que não há presença de lipídios soltos ou não agregados nas nanopartículas. Os dados demonstram descartam ainda a existência de outros tipos de organização como micelas.

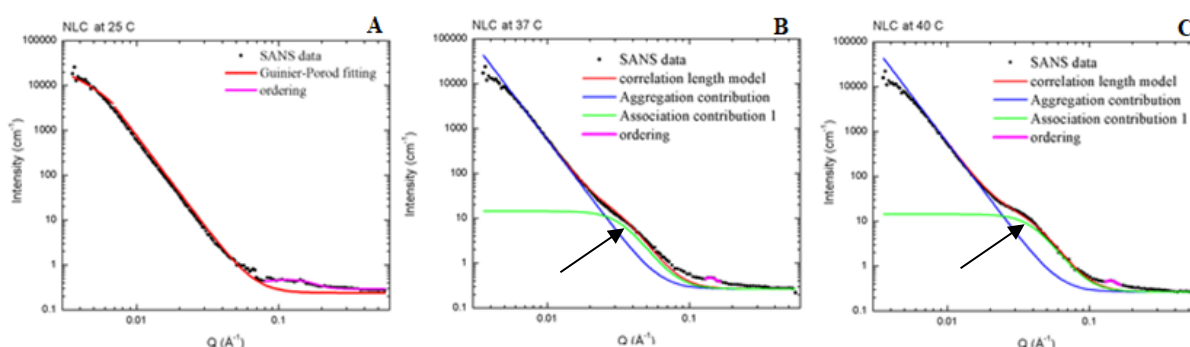


Figura 28: Espectro de SANS dos NLC sem fármaco em diferentes temperaturas: A) 25°C ; B) 37°C e C) 40°C .

A inclusão do fármaco no sistema provocou o desaparecimento do ordenamento observado na amostra de NLC controle, mas induziu o surgimento de um outro. As curvas de SANS na Figura 29 mostram a existência de estrutura lamelar dentro da NLC_{BZC} otimizada, cujos parâmetros de rede são apresentados na tabela 20. Os resultados dos sistemas com fármaco mostram que o parâmetro de rede aumenta com a temperatura.

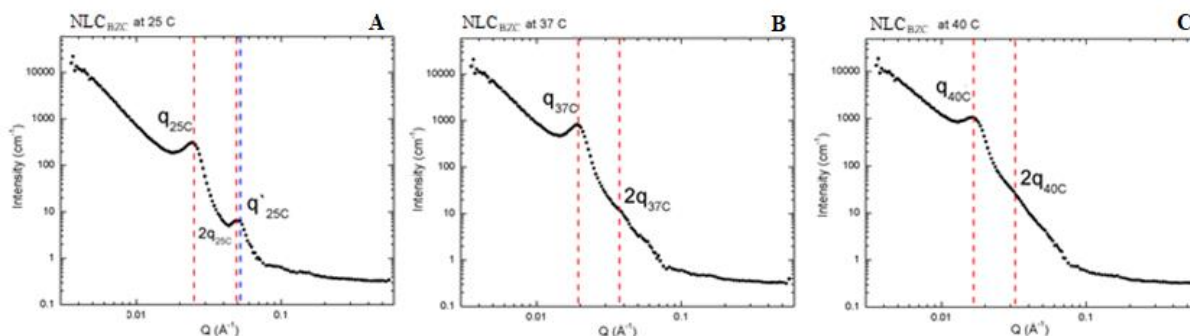


Figura 29: Efeito de BZC no espectro de SANS nos NLC em diferentes temperaturas: A) 25°C; B) 37°C e C) 40°C.

Tabela 20: SANS - Parâmetros de rede da amostra NLC_{BZC}, com o aumento da temperatura.

Temperatura (°C)	Parâmetro de rede (Å)
25	263
37	332
40	389

Barbosa e col. 2018 observaram arranjo lamelar na organização estrutural das nanopartículas lipídicas preparadas com o lipídio sólido palmitato de cetila, na presença do anestésico dibucaína (BARBOSA et al., 2018b). Tal característica foi também observada nos resultados de SANS de NLC preparadas com palmitato de cetila, na presença de tetracaína (CASTRO, 2016). A adição da BZC induziu a formação de estruturas lamelares dentro do carreador.

Os resultados relacionados ao raio de giro e ao expoente de Porod para as amostras com e sem BZC, nas temperaturas de 25° C, 37° C e 40° C, permaneceram os mesmos: -4,21 e -4 Å, respectivamente. O expoente de Porod nos fornece informações sobre a rugosidade da superfície da nanopartícula. Para todos os casos, o valor do expoente de Porod foi de 4 (adimensional), ou seja, indicando que a superfície da NLC é lisa. Valores menores (entre 3 e 4) indicam superfícies fractais e valores acima de 4 indicam casos raros, de superfície difusa (SHAH et al., 2019). Nas análises feitas, concluímos que as nanopartículas com e sem BZC apresentam superfícies perfeitamente lisas, compatíveis com dispersão do fármaco na matriz lipídica, sem adsorção, nem do fármaco nem de possíveis lipídios não incorporados.

Rodrigues da Silva e col. empregaram a técnica de Raman para observar a solubilização do AL, bupivacaína, em NLC. A composição de palmitato de cetila e Capryol 90® (lipídio

líquido análogo Capmul® utilizado no presente estudo) mostrou-se a mais promissora para solubilização de bupivacaína (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Em estudo de solubilização utilizando a mesma técnica foi possível observar que o Butamben, análogo da BZC, é bem solúvel em Capryol®90, mas não em CP. Assim a interação do anestésico com os lipídios sólidos e líquidos varia, explicando a formação de estruturas lamelares no interior do nanocarreador, demonstrado pelos resultados de SANS, que sugerem que a BZC induz a formação de uma estrutura lamelar dentro do carreador. Mesmo assim, a benzocaína não altera o tamanho do raio de giro das NLC, não induz aparecimento de clusters hidrofóbicos, nem altera a rugosidade da superfície da nanopartícula.

4.4 Medidas da cinética de liberação *in vitro*

Os testes de liberação *in vitro* de formulações analisam o perfil de liberação do fármaco, ou seja, relaciona-se com a saída do mesmo da matriz lipídica das nanopartículas. Segundo KAUR et al. (2015), a avaliação permite comparar a capacidade de diferentes amostras de reter o fármaco incorporado, durante um tempo mais longo.

A liberação *in vitro* de BZC encapsulada em NLC foi investigada experimentalmente utilizando membranas sintéticas, em células de difusão vertical do tipo Franz, como descrito no item 3.2.6. A Figura 30 mostra o perfil de liberação da BZC livre e de NLC_{BZC}, por um período de 25 horas, em temperatura constante de 37°C.

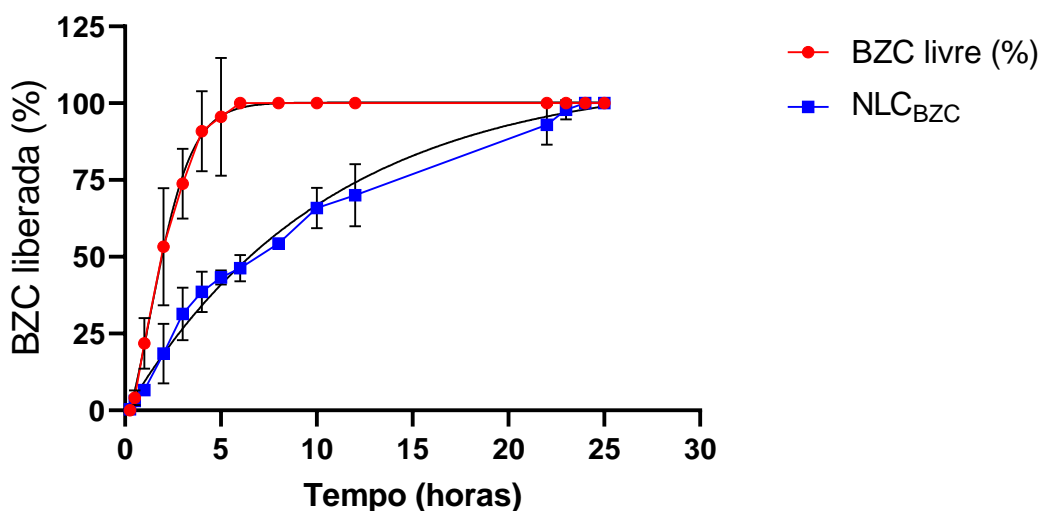


Figura 30: Perfil de liberação *in vitro* de BZC livre e encapsulada na NLC_{BZC}, durante 25 horas, na temperatura de 37°C.

Nota-se que o equilíbrio da BZC liberada do compartimento doador foi relativamente rápido, com valores acima de 90% de liberação em 4 h de ensaio e alcançado 100% de BZC liberada em 6 h. Tal característica foi observada em ensaios de liberação com BZC na literatura, que demonstram taxa de liberação de BZC *in vitro* acima de 90% em 4 horas de ensaio (BASHA et al., 2015; NOSHI, 2018). No perfil de liberação de NLC_{BZC}, notou-se uma evolução mais lenta da porcentagem liberada do fármaco em função do tempo, apresentando 70% de liberação após 12 h de ensaio, e 100% de liberação em 24 h. Esse resultado é compatível com a encapsulação da BZC nos NLC desenvolvidos, comprovando que o sistema levou a uma redução significativa da porcentagem liberada do fármaco em relação ao controle.

A literatura menciona os fatores que seriam capazes de influenciar o perfil de liberação do fármaco a partir de NLC, tais como: tamanho de nanopartícula, matriz lipídica, surfactante, concentração de fármaco na matriz de lipídica e a característica dos medicamentos (MUHLEN et al. 1998; DAN, 2014; ÜNER et al., 2014; KAUR et al., 2015; NAGAICH & GULATI, 2016). É considerado ainda que o perfil de liberação do fármaco *in vitro* depende das seguintes condições experimentais: temperatura e propriedade das nanopartículas, como a organização e temperatura de fusão dos lipídios (SILVA et al., 2016).

Trabalhos anteriores ressaltam o aumento do tempo de liberação de diferentes anestésicos, utilizando NLC como sistema de liberação sustentada. Castro e col. (2016), demonstraram o aumento do tempo de liberação em formulações contendo tetracaína em NLC (CASTRO, 2016). Ribeiro e col. (2017) utilizando lipídios naturais encapsularam lidocaína em NLC e observaram que estes nanocarreadores foram capazes de manter perfil de liberação *in vitro* por 24 horas (RIBEIRO et al., 2017). Rodrigues da Silva e colaboradores (2017) também demonstraram perfil de liberação prolongado em formulação de NLC contendo bupivacaína acima de 28 horas (RODRIGUES DA SILVA et al, 2017).

Esses dados confirmam que a NLC desenvolvida apresenta características eficientes para liberação sustentada de BZC, podendo aumentar seu tempo de ação anestésica e reduzir sua toxicidade, devido sua liberação gradual.

4.4.1 Modelagem matemática dos perfis de liberação *in vitro*

A liberação do fármaco e seu desempenho *in vivo* podem ser alteradas pelas alterações qualitativas e quantitativas em uma formulação. Portanto, a utilização de ferramentas que facilitem o desenvolvimento do produto capazes de reduzir a necessidade de estudos *in vivo* é

sempre desejável. Sendo assim, uma forma de prever o desempenho *in vivo* pode ser considerado como o desenvolvimento racional de DDS refere-se ao uso dos dados de dissolução *in vitro* (DASH et al., 2010).

Inúmeros modelos cinéticos descrevem o perfil de liberação total do fármaco a partir dos sistemas de carregamento de fármacos e das formas de dosagem, tais como: os de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson Crowell, Weibull e Baker-Lonsdale (LOBO & COSTA, 2001; AVACHAT & KOTWAL, 2007; DASH et al., 2010; LACATUSU et al., 2014; ÜNER et al. 2014).

Através do software KinetDS 3.0, a curva de liberação do NLC_{BZC} foi ajustada a vários modelos cinéticos. O modelo de Baker-Lonsdale, desenvolvido a partir do modelo de Higuchi, apresentou o maior valor do coeficiente de correlação (r^2), usado como um indicador do ajuste dos modelos, conforme apontado na tabela 21.

Tabela 21: Ajuste matemático das curvas de liberação da BZC a partir do NLC otimizado.

	r^2						
Modelos	Ordem zero	Primeira Ordem	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	Weibull	Baker-Lonsdale
NLC _{BZC}	0,9233	0,4685	0,5789	0,6814	0,8939	0,9108	0,9472

De acordo com o modelo de Baker e Lonsdale (equação 16), um gráfico relacionando a parte esquerda da equação e o tempo serão lineares se as condições estabelecidas forem cumpridas, com a constante de liberação (k) correspondendo à inclinação da reta. Derivados do modelo Higuchi, o modelo descreve a liberação sustentada de fármacos a partir de matrizes esféricas, com a combinação da difusão e degradação como fatores responsáveis pelo mecanismo de liberação (Figura 31) (BAKER, 1987; SHI et al., 2010).



Figura 31: Modelo esquemático do perfil de liberação a partir das NLC_{BZC}.

Este resultado condiz com outros trabalhos na literatura. MONTOLLO et al., 2018 e SANTIAGO et al., 2018 realizaram o desenvolvimento de NLC contendo carbamazepina e anfotericina B, respectivamente. Em ambos resultados o modelo Baker-Lonsdale foi o que melhor descreveu o comportamento de liberação dos fármacos a partir dos NLC.

4.5 Ensaio *in vivo*: atividade antinociceptiva

Através do teste de retirada da cauda (*tail flick*), foi avaliada a atividade antinociceptiva de BZC livre e encapsulada no NLC otimizado, após a incorporação em gel de Carbopol®, como descrito no item 3.2.8.2. O teste de *tail flick* é amplamente usado como um ensaio para avaliar a eficácia antinociceptiva de agentes farmacológicos. Ele é altamente preditivo da eficácia analgésica em humanos. No referido método, o estímulo nocivo é um dispositivo de aquecimento ou uma fonte de calor radiante, colocado em contato com a cauda do animal (NESS & GEBHART, 1986).

Os hidrogéis de Carbopol®, preparados de acordo com o item 3.2.8.1, apresentaram as concentrações finais de 3% BZC livre, 1,5 e 3% NLC_{BZC}. Utilizou-se também o gel comercial Benzotop®, com concentração final de 20% de BZC livre, para fins comparativos. Os géis foram aplicados topicamente, na base da cauda dos camundongos. Após 30 min., iniciou-se a coleta das medidas.

Como mostra a Figura 32, todas as formulações causaram analgesia após os 30 min. iniciais. A BZC livre, na concentração de 3,0 %, apresentou efeito analgésico total em 4 h, em boa concordância com o resultado obtido no ensaio de liberação *in vitro*. A formulação de NLC_{BZC}, na concentração de 1,5%, apresentou efeito analgésico similar ao da BZC livre à 3,0%. Já no gel comercial Benzotop®, com concentração de 20% de BZC, a analgesia alcançada ultrapassou 18 horas. Observamos que a formulação de NLC_{BZC} à 3% apresentou ao tempo de anestesia similar ao do gel comercial, apesar da concentração do ativo ser 6 vezes menor. Cabe mencionar que na fase de desenvolvimento a concentração de 3% de BZC foi a máxima possível de solubilizar e incorporar nos NLC, sem causar desestabilização.

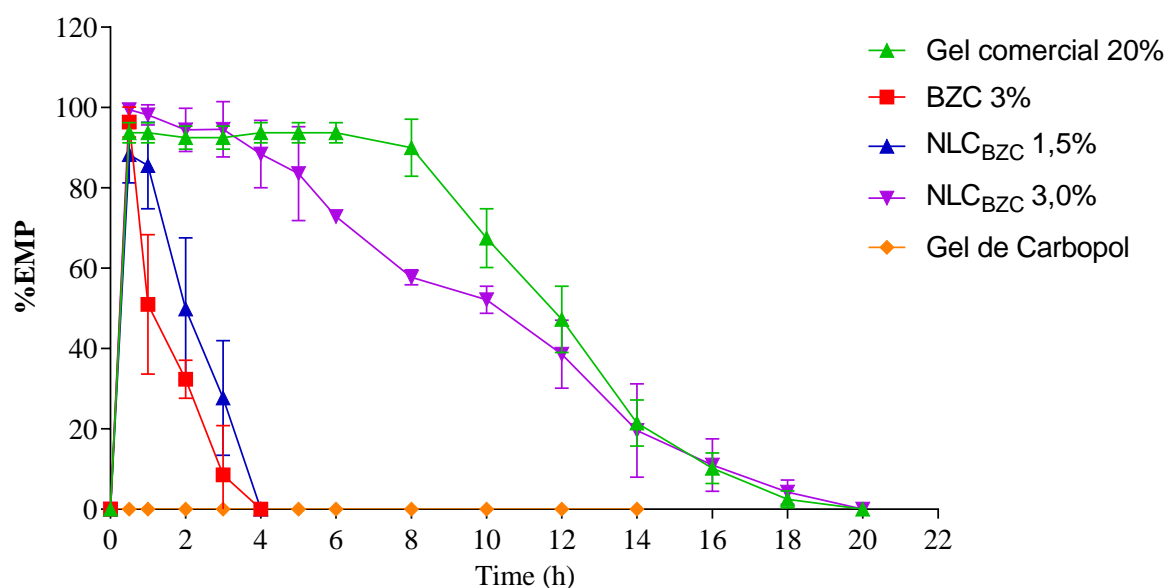


Figura 32: Ensaios de ação antinociceptiva (efeito máximo possível, %EMP, teste de *tail flick* - em camundongos) em função do tempo. Teste estatístico One-way ANOVA com Turkey-Kramer *post hoc*: $p < 0.05$.

Na Figura 33 os resultados são apresentados em relação à área sob a curva (ASC_{0-25}) do efeito anestésico medido na Figura 32. Foi constatado tempo de anestesia do gel de Carbopol® contendo NLC_{BZC} a 3% de 18 h, apresentando boa eficácia de anestesia tópica. Não foi observada variação estatística significativa ($p < 0,05$) na comparação entre as formulações de BZC livre a 20% e 3%, e entre NLC_{BZC}, a 1,5% e 3,0%. Estes resultados confirmam a eficácia do sistema desenvolvido, pois foi observado um efeito analgésico similar ao gel comercial, porém com concentração significativamente menor de benzocaína, o que pode diminuir seus efeitos tóxicos indesejáveis, como alergia, por exemplo.

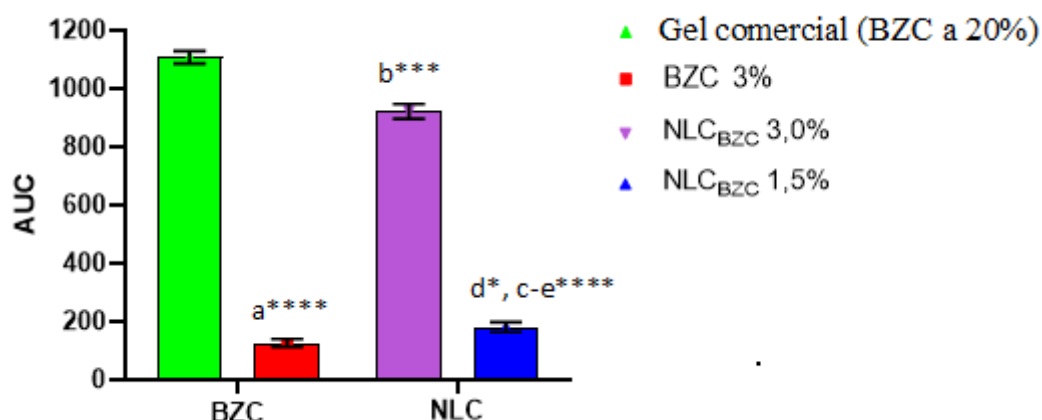


Figura 33: Área sob a curva (efeito-tempo) após aplicação tópica de benzocaína: Gel comercial (BZC a 20%) e BZC 3%, NLC_{BZC} a 1,5 e 3,0%. Análise estatística: One-way ANOVA com Turkey-Kramer *post hoc*: a, BZC 3,0% x BZC 20%; b, BZC 20% x NLC_{BZC} 3,0%; c, NLC_{BZC} 3,0% x NLC_{BZC} 1,5%; d, BZC 3,0% x NLC_{BZC} 1,5%; e, BZC 20% x NLC_{BZC} 1,5%. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ***** $p < 0.0001$.

Ao analisar os dados obtidos, podemos sugerir que o sistema aumentou a fluidez da matriz lipídica do estrato córneo e a solubilidade de lipídios e proteínas. A incorporação do fármaco junto ao NLC permitiu o aumento da permeabilidade da BZC, diminuiu a irritabilidade e melhorou o direcionamento do ativo para o local de ação.

A promoção da permeação da BZC por intermédio de nanopartículas lipídicas foi conseguida através da incorporação do sistema junto ao gel de Carbopol®, o que permitiu o efeito de aderência, oclusão e hidratação da pele. As propriedades adesivas do gel levaram à formação de uma monocamada hidrofóbica na pele, o que produziu um efeito oclusivo e levou à diminuição da perda de água transepidermica reduzindo a organização dos corneócitos e aumentando do espaço inter-corneocitário, com a consequente penetração do fármaco para as camadas mais profundas (THASSU, 2007; VITORINO et al, 2013). Dessa forma, o sistema foi capaz de melhorar o transporte do fármaco através da pele, pela redução temporária e reversível das suas propriedades barreira e consequente aumento da permeabilidade.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, utilizando carreadores lipídicos nanoestruturados, foi desenvolvida uma nova formulação de liberação sustentada para o anestésico local benzocaína. Para o desenvolvimento, foram escolhidos os seguintes componentes: palmitato de cetila, Capmul® PG8-NF e Pluronic® F68 como lipídios sólido, líquido e surfactante, respectivamente. A partir do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, foi otimizada esta formulação e encontrada a quantidade ideal de cada excipiente, considerando as respostas de menores tamanho de partículas e PDI e máximo potencial zeta, em módulo. A formulação otimizada, com 25% de concentração lipídica, razão de 60:40 de lipídio sólido:lipídio líquido, 5% de Pluronic F-68 e 3% de benzocaína, apresentou partículas com diâmetro médio de $\sim 188,1 \pm 3,6$ nm, baixo PDI ($0,090 \pm 0,024$), potencial zeta de $-35,2 \pm 0,8$ mV e $1,67 \pm 0,02 \times 10^{14}$ partículas/mL. A adição de BZC aumentou ligeiramente o tamanho médio das partículas, demonstrando que o fármaco foi encapsulado. As análises de DSC, DRX e SANS mostraram que a encapsulação de BZC nas nanopartículas diminuiu a organização estrutural dos lipídios na matriz. Houve, ainda, diminuição da entalpia e da cristalinidade lipídica. Po SANS, notamos que o fármaco alterou a estrutura do interior lipídico das NLC, modificando o ordenamento observado no sistema sem o fármaco, e induzindo o surgimento de outro (arranjo lamelare).

No estudo da estabilidade da formulação, notamos que a mesma se manteve estável durante o período analisado de doze meses, sem diferenças estatísticas significativas no tamanho, PDI, potencial zeta, %EE, pH e concentração de partículas/mL.

A formulação otimizada foi incorporada em gel de carbopol, para aplicação tópica. A avaliação farmacológica do gel de NLC_{BZC} (3%), através do teste de analgesia (*tail flick*) em camundongos demonstrou que o sistema foi capaz de produzir anestesia equivalente ao do gel comercial Benzotop®, em concentração *ca.* de sete vezes maior do anestésico.

Dessa forma, podemos concluir que este novo sistema de liberação para BZC é promissor para aumentar o tempo de anestesia, e permitiu diminuir a dose necessária para produzir o mesmo efeito da formulação comercial. Acreditamos que a formulação desenvolvida, com NLC_{BZC} associada ao gel de carbopol é eficaz e inovadora para atuar no controle da dor, com início rápido (30 min) e duração prolongada (de até 18 h) proporcionando assim maior conforto ao paciente. Destacamos que com NLC_{BZC} é possível alcançar uma atividade analgésica prolongada, com concentração reduzida de BZC (3%), com consequente redução da toxicidade anestésica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKARI et al. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. **Material Science and Engineering C68**: 2016, p.299-307.
- ALI, H. et al. Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: Evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (¹H NMR). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**: 2010, v. 77, n. 2, p. 286–297.
- ANVISA, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, In: Saúde, M. d. (ed), resolução RE nº 899, Brasil, 2003.
- ASADUJJAMAN, A. et al. Thermoresponsive functional polymers based on 2,6-diaminopyridine motif with tunable UCST behaviour in water/alcohol mixtures. **Polymer Chemistry**: 2017, v;8, p.3140-3153.
- AVACHAT, A. & KOTWAL, V. Design and Evaluation of Matrix-Based Controlled Release Tablets of Diclofenac Sodium and Chondroitin Sulphate. 2007, v. 8, n. 4, p. 4–9.
- BAKER, R.W. Controlled release of biologically active agents, Wiley-Interscience, New York, 1987.
- BARBOSA, R.M. et al. Solid Lipid Nanoparticles for Dibucaine Sustained Release. **Pharmaceutics**: 2018a, v.10(4), p.231.
- BARBOSA, R.M. et al. Electron Paramagnetic Resonance and Small-Angle X-ray Scattering Characterization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Dibucaine Encapsulation. **Langmuir**. 2018b, v. 34, p.13296–13304.
- BARKE, A. Chronic Pain has arrived in the ICD-11. International Association for the Study of Pain (IASP). Available from: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsDetail.aspx?ItemNumber=8340>
- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**: 2001, v.14 (2), p.101-114.
- BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**: 2012, v.30, n.3, p.257-262.
- BASHA, M. et al. Benzocaine loaded solid lipid nanoparticles: formulation design, *in vitro* and *in vivo* evaluation of local anesthetic effect. **Current drug delivery**: 2015, v.12, p. 680-692.
- BATTAGLIA, L. & GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**: 2012, v. 9, n. 5, p. 497–508.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**: 2016, v. 12, n. 1, p. 143–161.

BIANCHIN, M.D. et al. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**: 2015, v. 30, p. 180–189.

BRASIL, Resolução RDC 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre as boas práticas de manipulação de medicamentos para uso humanos em farmácia e seus anexos, ANVISA, Diário Oficial da União de 09/10/2007, 29-58.

BRUGÈ, F. et al. A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts. **International Journal of Pharmaceutics**: 2015, v.495, n. 2, p. 879–885.

BRUNTON, L. et al. Anesthetic Local. In: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 13th ed. Mc Graw Hill Education; 2018. p.1808.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**: 2011, v. 16, n. 5, p. 405–411.

BUTTERWORTH, J. F. & STRICHARTZ, G. R. Molecular Mechanisms of Local Anesthesia: A Review. **Anesthesiology**: 1990, v. 72, p. 711–734.

CARBONE, C. et al. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. **European journal of medicinal chemistry**: 2012, v. 49, p. 110–117.

CARVALHO, L.B. & PINTO, L.M.A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**: 2012, v.74, p.375–381.

CASTRO, S. R. **Preparo e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em hidrogéis termorreversíveis para liberação tópica do anestésico local tetracaína**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas/SP, 2016.

CATTERALL, W.A. & MACKIE, K. Local Anesthetics. In: Brunton L, Hilal-Danda R, Knollmann B, editors. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13th ed. New York: McGraw-Hill: 2017, p.1440.

CEREDA, C.M.S. Estudo de permeação cutânea e biocompatibilidade de formulações de anestésicos locais em géis lipossomais. Instituto de Biologia: Deptº Bioquímica. Unicamp: 2013.

CEREDA, C.M.S. et al. Liposomal butamben gel formulations: toxicity assays and topical anesthesia in an animal model. **Journal of Liposome Research**. Early Online: 2016, p.1-9.

CEVC G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Review**: 2004, v.56(5), p.675-711.

CHAN, E.J. et al. On the polymorphism of benzocaine: A low-temperature structural phase transition for form (II). **Acta Crystallographica B Structural Science**: 2009, v.65, p.509–515.

CHEN, Y. et al. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**: 2014, v.455, p.36-43.

CHEN, H. et al. Development of a ropivacaine-loaded nanostructured lipid carrier formulation for transdermal delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**: 2015, v. 465, p.130–136.

CHIAPPETTA, D. A. & SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2007, v.66, n.3, p. 303–317.

COLLETT, J. & MORETIN, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2a edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.298–313.

COLUMB, M.O. & HARTLEY, R. Local anaesthetic agents. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**: 2014, v.15 (2), p.83–87.

CONSTANZO, A. et al. Programmed cell death in the skin. **International Journal of Developmental Biology**: 2015, v.59, n.1-3, p.73-78.

CORTESI, R. et al. L-dopa co-drugs in nanostructured lipid carriers: A comparative study. **Materials Science and Engineering C**: 2017, v.72, p.168-176.

COSTA, R. & SANTOS, L. Delivery systems for cosmetics – From manufacturing to the skin of natural antioxidants. **Powder Technology**: 2017, v.322, p. 402-416.

COVINO, B. G.; VASSALO, H. G. Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico, Rio de Janeiro: Colina, 1986.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A Method For Determining Loss of Pain Sensation. **The Journal of Pharmacology**: 1941, v. 27, p. 74–79.

DAN, N. Nanostructured Lipid Carriers: Effect of Solid Phase Fraction and Distribution on the Release of Encapsulated Materials. **Langmuir**: 2014, v. 30, p.13890–13814.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. 2010, v.67, n.3, p.217–223.

DAHSHAN, A. & DONOVAN, G.K. Severe Methemoglobinemia Complicating Topical Benzocaine Endoscopy in a Toddler: A Case Report and Review of Literature. **Pediatrics**: 2006, v.117, p.806-809.

de ARAÚJO, D.R. et al. Formulações de Anestésicos Locais de Liberação Controlada: Aplicações Terapêuticas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**: 2003, v. 53, p. 663–671.

de ARAÚJO et al. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Canadian Journal of Anesthesia**: 2004, v.51 (6), p.566–572.

de ARAÚJO, D.R. et al. Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**: 2008, v.31, p.1775–1783.

de ARAÚJO, D.R. et al. Bioadhesive films containing benzocaine: correlation between in vitro permeation and in vivo anesthetic effect. **Pharmaceutical Research**: 2010, v.27, p.1677-1686.

de ARAÚJO, D.R. et al. Strategies for delivering local anesthetics to the skin: focus on liposomes, solid lipid nanoparticles, hydrogels and patches. **Expert Opinion on Drug Delivery**: 2013, v.10, p.1551–1563.

de ARAÚJO, D.R. et al. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**: 2019, v.16(7), p.701-714.

de PAULA, E. et al. Drug delivery systems for local anesthetics. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**: 2010, v.4, n.1, p.23–34.

de PAULA, E. et al. Micro and nanosystems for delivering local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**: 2012, v. 9, n. 12, p. 1505–1524.

DOKTOROVÁ, S. et al. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2016, v.108, p.235–252.

ECKHART, L. et al. Cell death by cornification. **Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**: 2013, v.1833, n.12, p.3471-3480.

ELDER, R. Final Report on the Safety Assessment of Octyl Palmitate, Cetyl Palmitate and Isopropyl Palmitate. **International Journal of Toxicology**: 1982, v.1, n.2, p.13–35.

ESPOSITO, E. et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. **Pharmaceutical Research**: 2008, vol.25, n.7.

FANGUEIRO, J. F. et al. Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**: 2012, v.100, p.84–89.

FATHY, M. & ELADRY, M. Preparation and evaluation of piroxicam-pluronic solid dispersions. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**: Assuit University: 2003, v.26, p.97-108.

FILIFE, V. et al. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**: 2010, v.27, n.5, p.796–810.

FRACETO, L.F. et al. Interaction of Local Anesthetics with a Peptide encompassing the IV/S4–S5 linker of the Na⁺ channel. **Biophysical Chemistry**: 2006, v.24, p.29-39

FREITAS, C. & MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**: 1999, v.47, n.2, p.125–132.

FUCHS, E. & RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetics**: 2002, v.3, n.3, p.199-209.

FULIAS, A. et al. Thermal behaviour of procaine and benzocaine. Part II: compatibility study with some pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Chemistry Central Journal**: 2013, v.7, p.140.

GAO, W. et al. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. **Annals of Biomedical Engineering**: 2016, v.44(6), p.2049-2061.

GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**: 2008, v.60, n.11, p.1307–1315.

GLAZER, S. & PORTENOY, R.K. Systemic local anesthetics in pain control. **Journal of Pain Symptom Manage**: 1991, v.6 (1), p.30–39.

GONZALEZ-MIRA, E. et al. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. **Nanotechnology**: 2011, v.22, n.4, p.45101.

GORDILLO-GALEANO, A. & MORA-HUERTAS, E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2018.

GORDON, S.M. et al. Long-acting local anesthetics and perioperative pain management. **Dental Clinics of North America**: 2010, v.54 (4), p.611–620.

GRANT, G.J. et al. Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a mouse model. **Regional Anesthesia**: 1994, v.19 (4), p.264-269.

GRILLO, R. et al. Validation of an HPLC method for quantitative determination of benzocaine in PHBC-Microparticles and PLA-Nanoparticles. **Latin American Journal of Pharmacy**: 2009, v.28 (3), p.393-399.

GRILLO, R. et al. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of drug targeting**: 2010, v.18, n.9, p.688–699.

GROSS, J. et al. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of Polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. **European Journal of Pharm. and Biopharmaceutics**: 2016, v.104, p.30–41.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**: 2001, n.1-2, p.1-18.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**: 2008, v.315, n.1–3, p.210–216.

HAMMOUDA et al. SANS from Poly(ethylene oxide)/Water Systems. **Macromolecules**: 2002, v.35(22), p.8578–8585.

HEAVNER, J.E. Local anesthetics. **Current Opinion in Anaesthesiology**: 2007, v.20 (4), p.336–342.

HERMAN, A. & HERMAN, AP.P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**: 2005, v.67, n.4, p.473–485.

HU, F.Q. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**: 2005, v.45, n.3–4, p.167–173.

ICH, Validation of Analytical Procedures: text and methodology (Q2(R1): Internal Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2005.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**: 2008, v.346, n.1, p.124–132.

KALLURI, H. & BANGA, A.K. Transdermal delivery of proteins. **AAPS PharmSciTech**: 2011, v.12 (1), p.431–441.

KARANDE, P. & MITROGOTRI, S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. **Biochim Biophys Acta (BBA) – Biomembranes**: 2009, v.1788(11), p.2362–2373.

KAUR, S. et al. Nanostructure Lipid Carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. **Asian Pac. Journal of Health Sciences**: 2015, v.2, n.2, p.76–93.

KUNTSCHKE, J. et al. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**: 2011, n.417(1-2), p.120–137.

LACATUSU, I. et al. Design of soft lipid nanocarriers based on bioactive vegetable oils with multiple health benefits. **Chemical Engineering Journal**: 2014, v.246, p.311–321.

LACHMAN, L. et al. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Volume II. Lisboa: Fundação Colouste Gulbenkian, 2001.

LANÇAS, F.M. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise – Métodos Cromatográficos de Análise. **Rima**: 2004, São Paulo.

LAGAN, G. & McLURE, H. A. Review of local anaesthetic agents. **Current Anaesthesia & Critical Care**: 2004, v.15, n.4–5, p.247–254.

LASON, E. et al. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. **Acta Biochimica Polonica**: 2013, v.60, n.4, p.773–777.

LEE, H.S. Recent advances in topical anesthesia. **Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine**: 2016, n.16 (4), p.237-244.

LIN, T.K. et al. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. **International Journal of Molecular Sciences**: 2018, v.19, n.1.

LIRK, P. et al. Local anaesthetics: 10 essentials. **European Journal of Anaesthesiology**: 2014, n.31 (11): p.575–585.

LOBO, M. S. & COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**: 2001, v.13, p.123–133.

LOSQUADRO, W.D. Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. **Facial Plastic Surgery of North America**: 2017, Aug. 25(3), p.283-289.

LOWRY, G. V. et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environmental Science Nano**: 2016.

MÄDER, K. & MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**: 2001, v.47, n.2–3, p.165–196.

MALAMED, S. F. Handbook of local anesthesia. [s.l.] **Elsevier**: 2013.

MARTIN, D.G. et al. Topical anesthetic-induced methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia in macaques: A comparison of benzocaine and lidocaine. **Journal of Applied Toxicology**: 1995: v.15, 153–158.

McLURE, H.A. & RUBIN, A.P. Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiology**: 2005, v.71: 59-74.

MENDES, A.I. et al. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**: 2013, v. 111, p. 755–763.

MENDES, I.T. et al. Development and characterization of nanostructured lipid carrier-based gels for transdermal delivery of donepezil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**: 2019, v.177, p.274-281.

MEREY, H.A. & ZAAZAA, H.E. Validated simultaneous determination of antipyrine and benzocaine HCl in the presence of benzocaine HCl degradation product. **Royal Society of Chemistry. Analytical Methods**: 2014.

MERINO, S. et al. Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer-Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery. **ACS Nano**: 2015, v. 26;9(5). p.4686-4697.

MOLOUGHNEY, J.C. et al. Poloxamer 188 (P188) as a membrane resealing reagent in biomedical applications. **Recent Patents on Biotechnology**: 2012, v.6(3), p.200-211.

MONTENEGRO, L. et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carrier: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**: 2016, v.32, p. 100-112.

MONTOLO, S. et al. Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and in vitro / in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**: 2018, v.167, p.73–81.

MORAES, C.M. et al. Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de bupivacaína (S75-R25) em nanoesferas de poli(lactídeo-co-glicolídeo). **Química Nova**: 2008, v.31 (8), p.2152-2155.

MUHLEN, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 1998, v. 45, p. 149–155.

MÜLLER, R.H. et al. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. **International Journal of Pharmaceutics**: 1996, v.144, n.1, p.115–121.

MÜLLER, R.H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug deliver- A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2000, v.50, n.1, p.161–177.

MÜLLER, R.H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**: 2002, n.54 Suppl 1: p.S131-S155.

MÜLLER, R.H. et al. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**: 2011, v.8 (3), p.207-227.

MURA, P. et al. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine loaded liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2007, v.67, p.86-95.

MURA, P. et al. Optimization of formulation variables of benzocaine liposomes using experimental design. **Journal of Liposome Research**: 2008, v.18, p.113-125.

NAGAICH, U. & GULATI, N. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate: design and in vivo characterization. **Drug Delivery and Translational Research**: 2016.

NAHAK, P. et al. Physicochemical studies on local anaesthetic loaded second generation nanolipid carriers. **Royal Society of Chemistry Advances**: 2015, v.5, n.33, p.26061–26070.

NAIK, A. et al. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**: 2000, v.3, n.9, p.318-326.

NARAHASHI, T. et al. The site of action and active form of local anesthetics. I. Theory and pH experiments with tertiary compounds. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**: 1970, v.171, p.33–44.

NAYAK, R. & SUDHA, P. Evaluation of three topical anaesthetic agents against pain: a clinical study. **Indian Journal of Dental Research**: 2006, v.17, p.155-160.

NESS, T. J. & GEBHART, G. F. Centrifugal modulation of the rat tail flick reflex evoked by graded noxious heating of the tail. **Brain Research**: 1986, v.386, n.1–2, p.41–52.

NEUPANE, Y. R. et al. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: Formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. **International Journal of Pharmaceutics**: 2014, v.477, n.1–2, p.601–612.

NETO, O.A. et al. *Dor princípios e prática*. Porto Alegre: Artmed, 2009.

NOSHI, S.H. Lipid-based drug delivery systems for the enhancement of topical delivery of benzocaine. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**: 2018, v.13, i.3, p.13-19.

OH, K. S. et al. Paclitaxel-loaded Pluronic nanoparticles formed by a temperature-induced phase transition for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**: 2010, v.148, n.3, p. 344–350.

PACZKOWSKA, M. et al. The analysis of the physicochemical properties of benzocaine polymorphs. **Molecules**: 2018, v.23, p.1737.

PARDEIKE, J. et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**: 2009, v.366, n.1–2, p.170–184.

PARK, K.K. & SHARON, V.R.A. Review of local anesthetics: minimizing risk and side effects in cutaneous surgery. **Dermatologic Surgery**: 2017, v.43, p.173–187.

PATHAK, P. & NAGARSENKER, M. Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery. **AAPS PharmSciTech**: 2009, v.10, n.3, p.985–992.

PAUDEL, K.S. et al. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. **Therapeutic Delivery**: 2010, v.1 (1), p.109-131.

PAWAR, K.R. & BABU, R.J. Polymeric and lipid-based materials for topical nanoparticle delivery systems. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**: 2010, v.27 (5), p.419-459.

PÉREZ-LOZANO, P. et al. A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine, propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**: 2005, v.39, p.920-927.

POURFARZAD, A. et al. Optimization of a novel improver gel formulation for Barbari flat bread using response surface methodology. **Journal Food Scientists Technologists**: 2014, v.51, n. October, p.2344–2356.

PRADHAN, M. et al. Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **Steroids**: 2015, v.101, p.56–63.

PRAUSNITZ, M.R. & LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**: 2008, v.26(11), p. 1261-1268.

PRIMOSCH, R.E. & ROLLAND-ASENSI, G. Comparison of topical EMLA 5% oral adhesive to benzocaine 20% on the pain experienced during palatal anesthetic infiltration in children. **Pediatric Dentistry**: 2001, v.23, p.11-14.

PUGLIA, C. et al. Development, characterization, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of benzocaine and lidocaine loaded nanostructured lipid carriers. University of Catania. Catania, Italy, 2011.

PUGLIA, C. & BONINA, F., Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion on Drug Delivery**: 2012, v.9 (4), p.429-441.

PUGLIA, C. et al. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: characterization, *in vitro* penetration and photostability studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**: 2014, v. 51, p. 211-217.

QUEIRÓZ, V. A. **Avaliação das atividades citotóxica, anestésica e da farmacocinética da Bupivacaína complexada com Hidroxipropil-beta-ciclodextrina, em associação com Sufentanil**. Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular—Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

RAGSDALE, D.S. et al. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. **Proceedings of National Academy of Sciences**: 1996, v.93, p.9270–9275.

RAHMAN, Z. et al. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2010, v.76, n.1, p. 127–137.

RANG, H. et al. Anestésico Local. In: Farmacologia. Elsevier Ltd; 2016.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**: 2004, v.27 (5), p.771-780.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**: 2016, v.93, p.192–202.

RIBEIRO, L.N.M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to *in vivo* studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**: 2017, v.106, p.102–112.

RIZVI, S.A.A. & SALEH, A.M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**: 2018, v.26 (1), p.64–70.

RODRIGUES DA SILVA, G.H. et al. Optimized NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of Bupivacaine (S75:R25). **International Journal of Pharmaceutics**: 2017, v.529, p.253-263.

RODRIGUES DA SILVA, G.H. et al. Injectable in situ forming nanogel: A hybrid Alginate-NLC formulation extends bupivacaine anesthetic effect. **Materials Science and Engineering: C**: 2020, 110608.

RODRIGUES DA SILVA, G.H. et al. Articaine in functional NLC show improved anesthesia and anti-inflammatory activity in zebrafish. **Scientific Reports**: 2020, n.10, 19733. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76751-6>

RUKTANONCHAI, U. et al. The effect of cetyl palmitate crystallinity on physical properties of gamma-oryzanol encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Nanotechnology**: 2008, v.19.

SACHDEVA, R. et al. Benzocaine-Induced Methemoglobinemia- a potentially fatal complication of transesophageal echocardiography. **Texas Heart Institute Journal**: 2003, v.30, p.308-310.

SAHOO, S. et al. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, characterization and evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces*: 2014, v. 120, p.193-199.

SALAS, S. et al. Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of lidocaine hydrochloride in alginate-Gantrez® microspheres. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**: 2008, v.47, p.501-507.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part II - Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2016.

SANTIAGO et al., Nanostructured lipid carriers containing Amphotericin B: Development, *in vitro* release assay, and storage stability. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**: 2018, v.48, p.372-382.

SAUPE, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - structural investigations on two different carrier systems. **Bio-Medical Materials and Engineering**: 2005, v.15 (5), p.393-402.

SAUPE, A. et al. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**: 2006, v.314, n.1, p.56–62.

SAWYER J. et al. Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera, Rapydan) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anaesthesia before vascular access. **Brazilian Journal of Anaesthesiology**: 2009, v.102(2), p.210-215.

SCHWARZ, C. & MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**: 1997, v.157 (2), p.171-179.

SCOTT ALTMAN, R. et al. Local anesthetics. **Annals of Emergency Medicine**: 1985, v.14. p.1209-1217.

SHAH, J. et al. New Local Anesthetics. **Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology**: 2018, v.32 (2), p.175-185.

SHAH, M.R. et al. Lipid-based nanocarriers for drug delivery and diagnosis. Elsevier: 1st edition: 2017.

SHAH, R. et al. Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability. In: **Springer Briefs in Pharmaceutical & Drug Development**: 2015, p.11–23.

SHAH, R.M. et al. Structure analysis of solid lipid nanoparticles for drug delivery: a combined USANS/SANS study. **Particle systems characterization**: 2019, 36, 1800359.

SHI, K. et al., Tocopheryl succinate-based lipid nanospheres for paclitaxel delivery: Preparation, characters, and in vitro release kinetics. **Drug Delivery**: 2010, v.17, p.1–10.

SHOVIANTARI, F. et al. Skin Penetration of Coenzyme Q10 in Nanostructure Lipid Carriers Using Olive Oil and Cetyl Palmitate. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**: 2017; 9(2): 142-145

SILVA, A.L.R. et al. Pharmaceutical composition comprising a local anaesthetic and a carboxyvinyl polymer, 2008. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/WO2008138089A2?cl=en>>. Acesso em: 13 dez. 2020.

SILVA, J.A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**: 2010, v.31 (3), p.125-131.

SILVA, L.A.D. et al. Clobetasol-loaded nanostructured lipid carriers for epidermal targeting. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**: 2016, v.2, p.1–9.

SLOWING, I. I. et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**: 2008, v.60, n.11, p.1278–1288.

SMITH, J.M. et al. Introdução à termodinâmica da engenharia química. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

SOBRAL, V.R.V. **Formulações em gel para liberação de benzocaína: composição, estabilidade, citotoxicidade e permeação na pele**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas/SP, 2012.

SOUTO, E.B. & LOPES, C.M. Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos. Porto: 2011.

STRICHARTZ, G.R. et al. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficient and pKa values of clinically used drugs. **Anesthesia and Analgesia**: 1990, v.71, p.158-170.

SUNKAVALLI, S. et al. Preparation and characterization of docetaxel self-nanoemulsifying powders (SNEPs): a strategy for improved oral delivery. **Korean Journal of Chemistry Engineering**: 2016.

TADICHERLA S. & BERMAN, B. Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. **Therapeutic and Clinical Risk Management**: 2006; v.2(1), p.99-113.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**: 2013, v.19, p.29-43.

TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 2007, v.67, n.1, p.141–148.

THASSU, D. Nanoparticulate drug delivery systems. **New York: Informa Healthcare**: 2007. Chapter 14, p.213-233.

THIMMARAJU, M.K. et al. Preparation and characterization of rosuvastatin calcium nanoemulsions. **Latin American Journal of Pharmacy**: 2013, n.32 (10), pg. 1445-1451.

TIWARI, R. & PATHAK, K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. **International Journal of Pharmaceutics**: 2011, v.415, n.1–2, p.232–243.

TORRE, L.G. et al. A mathematical model describing the kinetic of cationic liposome production from dried lipid films adsorbed in a multitubular system. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**: 2007, v.24 (04), p.477–486.

TORRES, L.H. et al. Characterization and cytotoxicity of a benzocaine inclusion complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**: 2018.

ÜNER, M. et al. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of Loratadine for Topical Application: Physicochemical Stability and Drug Penetration through Rat Skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**: 2014, v.13, n. May, p.653–660.

ÜNER, M. Characterization and Imaging of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. In: **Handbook of Nanoparticles**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 117–141.

UPRIT, S. et al. Preparation and characterization of Minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. **Saudi Pharmaceutical Journal**: 2013, v.21, n.4, p.379-385.

USP-42-NF37. **USP Monographs: Benzocaine**. 2019.

VAN TUIJL, I. et al. The effect of addition of intrathecal clonidine to hyperbaric bupivacaine on postoperative pain and morphine requirements after Caesarean section: a randomized controlled trial. **British Journal of Anaesthesia**: 2006, v.97, n.3, p.365–370.

VITORINO, C. et al. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. **Journal of Controlled Release**: 2013, v.167 (3), p.301-314.

VOGTT, K. et al. A new time-of-flight small-angle scattering instrument at the Helmholtz-Zentrum Berlin: V16/VSANS. **Journal of Applied Crystallography**: 2014, v.47, p.237-244.

WALTER, J.R. & XU, S. Therapeutic transdermal drug innovation from 2000 to 2014: current status and outlook. **Drug Discovery Today**: 2015, v.20, n.11, p.1293-1299.

WANG, J.C. et al. Mitochondrial mechanisms of neuronal rescue by F68, a hydrophobic Pluronic block co-polymer, following acute substrate deprivation. **Neurochemistry International**: 2017, v.109, p.126-140.

WANG, G.K. et al. A common local anesthetic receptor for benzocaine and etidocaine in voltage-gated $\mu 1$ Na⁺ channels. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**: 1998, v.435 (2), p.293–302.

WANG, G.K. & STRICHARTZ, G.R. State-dependent inhibition of sodium channels by local anesthetics: A 40-Year Evolution. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**: 2012, v.6 (2), p.120–127.

WEINIGER, C.F. et al. Extended release formulations for local anaesthetic agents. **Anaesthesia**: 2012, v.67(8), p.906–916.

WENNINGER, J.A. et al. **International cosmetic ingredient dictionary**. [s.l.] Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, 1995.

WILES, M.D. & NATHANSON, M.H. Local anaesthetics and adjuvants – future developments. **Anaesthesia**: 2010, v.65, p.22–37.

YOKAICHIYA, F. et al. Effects of doxorubicin on the structural and morphological characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) using small angle neutron scattering (SANS) and small angle X-ray scattering (SAXS). **Physica B: Condensed Matter**: 2007, p.1-6.

YU, H.Y. et al. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**: 2002, v.54 (9), p.1221-1227.

ZHANG, X. et al. Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology. **Powder Technology**: 2010, v.197, n.1–2, p.120–128.

ZUR MÜHLEN, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**: 1998, v.45, n.2, p.149–155.

ANEXO

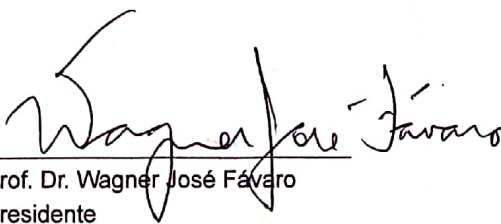
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O ANESTÉSICO LOCAL BENZOCAÍNA**, registrada com o nº **5428-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Enelda de Paula e Alessandro Delfino de Souza, Simone Ramos de Castro**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **14/11/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/12/2019 a 29/02/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 29/02/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	7 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	7 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	7 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	7 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	7 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios de Roedores da Bioquímica (bloco F), DBBT/IB /UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **05 de dezembro de 2019**.


Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP. Área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material: Alessandro Delfino Souza
Título do Trabalho: Tese Alex corrigida
Título do envio: Tese corrigida pós Turnitin
Nome do arquivo: Disserta_o_-_Alessandro_Souza_re...
Tamanho de arquivo: 3.72M
Contagem de páginas: 100
Contagem de palavras: 25,528
Contagem de caracteres: 146,171
Data de envio: 11-jan-2021 07:04PM (UTC-0200)
Identificação do Envio: 1485969716



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



ALESSANDRO DELFINO DE SOUZA

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA O ANESTÉSICO LOCAL
BENZOCAÍNA

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR THE LOCAL
ANESTHETIC BENZOCAINE

Campinas
2020